(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103608071 B
(45)授权公告日 2017.12.26

(21)申请号 201280030450.4

(22)申请日 2012.05.02

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103608071 A

(43)申请公布日 2014.02.26

(30)优先权数据
61/481,533 2011.05.02 US
61/550,545 2011.10.24 US
61/585,859 2012.01.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.12.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/036072 2012.05.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/151248 EN 2012.11.08

(73)专利权人 米伦纽姆医药公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 威洛·迪尔卢兹奥
诺贝尔·T·张
乔纳德·M·沃尔高
维斯阿纳桑·帕拉尼阿帕安
杰森·布朗 欧文·H·福克斯
凯瑟琳·肖尔茨

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
代理人 沈锦华

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)

(56)对比文件
JEFFREY L. CLELAND, et al..A Specific Molar Ratio of Stabilizer to Protein is Required for Storage Stability of a Lyophilized Monoclonal Antibody.《JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES》.2001,第90卷(第3期),第313页左栏第1段,第316页右栏第1段,第317页左栏第1段-右栏第1段,图5,表1,2.

审查员 陈皓

权利要求书2页 说明书56页
序列表8页 附图10页

(54)发明名称

抗α4β7抗体的制剂

(57)摘要

本发明描述包含非还原糖、抗α4β7抗体和至少一种氨基酸的混合物的抗体制剂。公开的制剂具有提高的稳定性、减少的聚集体形成,且可延迟其中抗α4β7抗体的降解或展现这些特性的任何组合。本发明进一步提供这些抗体制剂的一种易于遵循且在体内产生治疗有效量的所述抗α4β7抗体的安全给药方案。

CN 103608071 B

1.一种包含蔗糖、组氨酸、聚山梨醇酯80、至少120mg的抗α4β7抗体和精氨酸的稳定制剂，

其中所述制剂是冻干制剂，

其中根据阳离子交换色谱CEX测量，所述制剂包括所述抗体的至少55％主要同工型，

其中蔗糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)为至少650:1，

其中所述精氨酸与抗体的摩尔比为大于250:1；以及

其中所述抗体经人源化，包括重链可变区，所述重链可变区包括SEQ ID NO:2的氨基酸20-140；以及包括轻链可变区，所述轻链可变区包括SEQ ID NO:4的氨基酸20-131。

2.如权利要求1所述的制剂，其中所述聚山梨醇酯80与抗体的摩尔比为1:1。

3.如权利要求1或2所述的制剂，其中所述制剂是冻干的且在冻干之前包含5％至10％(w/v)抗α4β7抗体。

4.如权利要求3所述的制剂，其中冻干之前，所述制剂包括60mg/ml抗α4β7抗体、10％(w/v)蔗糖以及125mM精氨酸。

5.如权利要求1或2所述的制剂，其中所述制剂在25℃和60％相对湿度下稳定至少12个月。

6.如权利要求1或2所述的制剂，其中所述制剂在25℃和60％相对湿度下稳定至少24个月。

7.一种包含蔗糖、至少120mg的抗α4β7抗体、组氨酸、精氨酸和聚山梨醇酯80的稳定的药学制剂，

其中所述制剂是冻干制剂，

其中根据阳离子交换色谱CEX测量，所述制剂包括所述抗体的至少55％主要同工型，

其中蔗糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)为至少650:1，

其中组氨酸和精氨酸与抗体的摩尔比为200:1至500:1；以及

其中所述抗体经人源化，包括重链可变区，所述重链可变区包括SEQ ID NO:2的氨基酸20-140；以及包括轻链可变区，所述轻链可变区包括SEQ ID NO:4的氨基酸20-131。

8.如权利要求1、2和7中任一项所述的制剂，其中所述抗体是维多珠单抗。

9.如权利要求1、2和7中任一项所述的制剂，其中所述制剂包含至少25％重量的抗α4β7抗体。

10.如权利要求1、2和7中任一项所述的制剂，其中所述制剂包括45％至55％蔗糖(w/w)。

11.如权利要求1、2和7中任一项所述的制剂，其中所述制剂在小瓶中且所述小瓶含有300mg的所述抗α4β7抗体。

12.如权利要求1、2和7中任一项所述的制剂，其中所述制剂具有≥95％单体抗体。

13.如权利要求1、2和7中任一项所述的制剂，其中所述制剂具有≤2.5％聚集体。

14.一种稳定的药学制剂，其包含45％至55％蔗糖(w/w)、至少240mg抗α4β7抗体、组氨酸、10％至15％(w/w)精氨酸和聚山梨醇酯80；其中所述制剂是冻干制剂，其中根据阳离子交换色谱CEX测量，所述制剂包括所述抗体的至少55％主要同工型；以及其中所述抗体包括轻链可变区和重链可变区；所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸20-131以及所述重链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸20-140。

15.如权利要求14所述的制剂，其中所述蔗糖与抗体的摩尔比为至少700:1(摩尔:摩尔)。

16.如权利要求1、2、7、14和15中任一项所述的制剂，其中所述制剂在复原于水中时具有6.0-7.0的pH。

17.如权利要求1、2、7、14和15中任一项所述的制剂，其中所述制剂在复原于水中时具有6.0-6.5的pH。

18.一种制备如权利要求1至17中任一项所述的制剂的方法，所述方法包括在初级干燥期间维持产物温度低于塌陷温度。

19.如权利要求18所述的方法，其进一步包括退火步骤。

20.如权利要求19所述的方法，其中检测了水分含量。

21.如权利要求20所述的方法，其中所述水分含量是≤5.0％。

22.一种如权利要求1至17中任一项所述的制剂在制备用于治疗人患者的疾病或病症的药物中的用途，其中所述冻干制剂的量是有效治疗所述疾病或病症的量。

23.如权利要求22所述的用途，其中冻干制剂在投予人患者之前，溶于适合的介质或溶剂中以成为液体制剂。

24.如权利要求22或23所述的用途，其中所述药物用于治疗炎症性肠病。

25.如权利要求24所述的用途，其中炎症性肠病是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

抗α4β7抗体的制剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2012年1月12日提交的美国临时申请61/585,859、2011年10月24日提交的美国临时申请61/550,545和2011年5月2日提交的美国临时申请61/481,533的权益。前述申请的全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已通过EFS网以ASCII格式提交且据此以全文引用的方式并入本文的序列表。2012年4月30日创建的所述ASCII拷贝名为92596615.txt且大小为17,024字节。

[0005] 发明背景

[0006] 生物技术的进步使得有可能使用重组DNA技术产生多种蛋白质用于医药应用。因为蛋白质比传统有机和无机药物更大且更复杂(即除复杂三维结构外还具有多个官能团),所以配制所述蛋白质会造成特殊问题。为了使蛋白质保持生物活性,制剂必须保持蛋白质氨基酸的至少一个核心序列的构象完整性,同时保护蛋白质的多个官能团免遭降解。蛋白质可遭受缺乏稳定性,且单克隆和多克隆抗体特别可相对不稳定(参见例如Wang等,J.Pharm Sci.96:1-26(2007))。许多配制选项是可用的,但没有一种方法或系统适于所有蛋白质。已报道待考虑的若干因素(参见例如Wang等)。

[0007] 许多特征可影响蛋白质的稳定性。实际上,即使在纯化抗体的情况下,抗体结构也可能是异质的,此进一步使配制所述系统复杂化。此外,包括于抗体制剂中的赋形剂优选使任何潜在免疫反应减至最小。

[0008] 在抗体的情况下,保持构象完整性甚至更加重要。蛋白质的降解路径可涉及化学不稳定性(即涉及通过键形成或裂解来修饰蛋白质,从而产生新化学实体的任何过程)或物理不稳定性(即蛋白质的更高级结构变化)。化学不稳定性以例如脱酰胺、异构化、水解、氧化、片段化、聚糖β消除或双硫键互换(disulfide exchange)形式表现。物理不稳定性可由例如变性、聚集、沉淀或吸附造成。四种最常见蛋白质降解路径是蛋白质片段化、聚集、脱酰胺和氧化。治疗性蛋白质的化学或物理不稳定性的后果包括有效施用剂量减少、疗法的安全性归因于例如刺激或免疫反应性而降低以及归因于存放期较短而使制造更频繁。

[0009] 冷冻干燥是一种通常用于保存蛋白质的技术;冷冻干燥用于从相关蛋白质制剂移除水。冷冻干燥或冻干是一种待干燥物质首先冷冻且接着通过在真空下升华而移除冰或冷冻溶剂所用的方法。赋形剂可包括于预冻干制剂中以在冻干过程期间稳定蛋白质和/或提高冻干蛋白质制剂的稳定性(Pikal M.,Biopharm.3(9)26-30(1990)和Arakawa等Pharm.Res.8(3):285—291(1991))。

[0010] 数个公布已大体上公开治疗炎症性肠病的各种方法,且提供用于施用旨在治疗炎症性肠病的药剂的给药方案。例如,WO96/24673公开粘膜血管地址素(addressin)及对与因白细胞结合于表达MAdCAM的细胞所致的白细胞募集至胃肠道相关的疾病的治疗。U.S.2005/0095238描述治疗与白细胞浸润粘膜组织相关的疾病的方法及向人施用有效量的对α4β7整合素(integrin)具有结合特异性的人或人源化免疫球蛋白或抗原结合片段。U.S.2005/0095238进一步描述各种剂量(例如每千克体重0.15mg、约0.5mg、约1.0mg、约

1.5mg或约2.0mg免疫球蛋白或片段)和剂量之间的各种间隔(7天、14天、21天、28天或30天)。然而,以上提及的专利和公布并未公开本文中描述且要求的抗α4β7抗体的特定制剂或特定剂量和给药方案。重要的是,以上提及的专利并未公开为本文中描述且要求的治疗方法(由临床试验数据支持)提供的制剂、剂量和给药方案。

[0011] 本发明的抗体制剂可适用于抑制白细胞结合于表达MAdCAM的细胞且因此帮助治疗患者的炎症性肠病。因此,急需发现这些化合物的适合剂量和给药时程,且急需开发在长时间段内以稳定及适宜形式产生稳态治疗有效血液含量的抗体制剂的制剂,优选为静脉内制剂。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明是关于鉴定作为适用于配制抗α4β7抗体制剂的赋形剂的非还原糖和至少一种氨基酸,所述制剂的不稳定性使其易经受脱酰胺、氧化、异构化和/或聚集。制剂会提高稳定性,减少聚集体形成且延迟其中抗体的降解。

[0014] 因此,在第一方面,本发明是关于一种包含非还原糖、抗α4β7抗体和至少一种游离氨基酸的混合物的稳定制剂,且非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于600:1。制剂可为液体制剂或干燥制剂(例如冻干制剂)。制剂也可含有缓冲剂。在一些实施方案中,非还原糖是甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖或其任何组合。

[0015] 在一些实施方案中,制剂的游离氨基酸为组氨酸、丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸或其任何组合。制剂可包含约50mM至约175mM之间的游离氨基酸。制剂可包含约100mM与约175mM之间的游离氨基酸。游离氨基酸与抗体的摩尔比可为至少250:1。

[0016] 制剂也可含有表面活性剂。表面活性剂可为聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆(poloxamer)或其任何组合。

[0017] 在一些方面,制剂可使抗α4β7抗体的免疫原性减至最小。

[0018] 例如呈干燥状态的制剂可在40℃、75%相对湿度(RH)下稳定至少三个月。

[0019] 在另一方面,将制剂冻干且其在冻干之前包含至少约5%至约10%抗α4β7抗体。制剂可在冻干之前含有至少约6%抗α4β7抗体。制剂可从冻干制剂复原(例如复原以构成稳定液体制剂)。

[0020] 在另一方面,本发明是关于一种包含非还原糖、抗α4β7抗体和至少一种游离氨基酸的混合物的稳定制剂,且非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于600:1且游离氨基酸与抗α4β7抗体的比率(摩尔:摩尔)大于250:1。

[0021] 在另一方面,本发明是关于一种在水溶液中包含非还原糖、抗α4β7抗体和至少一种游离氨基酸的稳定液体制剂,其中非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于600:1。在另一方面,本发明涉及一种包含至少约40mg/ml至约80mg/ml抗α4β7抗体、至少约50—175mM一种或多种氨基酸和至少约6%至至少约10%(w/v)糖的液体制剂。液体制剂也可含有缓冲剂。在一些实施方案中,液体制剂也包含金属螯合剂。在一些实施方案中,液体制剂也包含抗氧化剂。

[0022] 在另一方面,本发明是关于一种包含至少约60mg/ml抗α4β7抗体、至少约10%(w/v)非还原糖和至少约125mM一种或多种游离氨基酸的液体制剂。

[0023] 在另一方面,本发明是关于一种包含至少约60mg/ml抗α4β7抗体、至少约10%(w/v)非还原糖和至少约175mM一种或多种游离氨基酸的液体制剂。

[0024] 在另一方面，本发明也关于一种包含非还原糖、抗α4β7抗体、组氨酸、精氨酸和聚山梨醇酯80的混合物的干燥制剂，例如冻干制剂，其中所述制剂呈固体形式，且非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于600:1。

[0025] 在另一方面，本发明是关于一种包含非还原糖、抗α4β7抗体、组氨酸、精氨酸和聚山梨醇酯80的混合物的冻干制剂。在这个方面，非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于600:1。此外，制剂中精氨酸与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于250:1。

[0026] 在另一方面，本发明是关于一种制备本文所述的制剂的方法，所述方法包括在初级干燥期间维持产物温度低于塌陷温度。方法也可含有退火步骤。

[0027] 在一个方面，本发明是关于一种治疗罹患炎症性肠病的人患者的方法，其中所述方法包括以下步骤:向罹患炎症性肠病的患者施用对人α4β7整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段包含非人来源的抗原结合区和人来源抗体的至少一部分，其中根据以下给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段:(a)以静脉内输注形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的初始剂量;(b)随后在初始剂量之后约两周时，以静脉内输注形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第二后续剂量;(c)随后在初始剂量之后约六周时，以静脉内输注形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第三后续剂量;(d)随后视需要在人源化抗体的第三后续剂量之后每四周或每八周，以静脉内输注形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第四和后续剂量;其中给药方案诱导患者的炎症性肠病的临床反应和/或临床缓解;且此外，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对α4β7复合物具有结合特异性，其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)以及重链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3):轻链:CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11;重链:CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、CDR3SEQ ID NO:14。

[0028] 在另一方面，本发明是关于一种用于治疗性治疗炎症性肠病的给药方案，其中所述给药方案包括以下步骤:向罹患炎症性肠病的患者施用对人α4β7整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段包含非人来源的抗原结合区和人来源抗体的至少一部分，其中根据以下给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段:(a)以静脉内输注形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的初始剂量;(b)随后在初始剂量之后约两周时，以静脉内输注形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第二后续剂量;(c)随后在初始剂量之后约六周时，以静脉内输注形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第三后续剂量;(d)随后视需要在人源化抗体的第三后续剂量之后每四周或每八周，以静脉内输注形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第四和后续剂量;其中给药方案诱导患者的炎症性肠病的临床反应和/或临床缓解;且此外，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对α4β7复合物具有结合特异性，其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)以及重链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3):轻链:CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11;重链:CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、CDR3SEQ ID NO:14。

[0029] 在一些方面，用抗α4β7抗体制剂的治疗方法、剂量或给药方案可使抗α4β7抗体的

免疫原性减至最小。

[0030] 患者可已对用免疫调节剂、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)拮抗剂中的至少一者或其组合进行的治疗缺乏足够反应、丧失反应或不耐受。

[0031] 炎症性肠病可为克罗恩氏病(Crohn's disease)或溃疡性结肠炎。炎症性肠病可为中度至重度活动性溃疡性结肠炎。

[0032] 给药方案可使得罹患中度至重度活动性溃疡性结肠炎的患者的粘膜愈合。

[0033] 患者可能先前已接受用至少一种用于炎症性肠病的皮质类固醇的治疗。给药方案可使得患者的皮质类固醇使用减少、消除或减少以及消除。

[0034] 在一些方面,以约1.0mg/ml至约1.4mg/ml之间的浓度以某一最终剂型施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段。可以约1.2mg/ml的某一最终剂型施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段。人源化免疫球蛋白或抗原结合片段可在30分钟内向患者施用。

[0035] 人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段可从冻干制剂复原。

[0036] 人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段可复原以构成稳定液体制剂。

[0037] 在一些方面,给药方案不改变接受所述治疗的患者的脑脊髓液中的CD4与CD8比率。

[0038] 患者可为65岁或65岁以上人士且不需要对给药方案进行任何调整。

[0039] 附图简述

[0040] 图1是对编码人源化抗α4β7免疫球蛋白的重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)和重链的推导氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的说明。核苷酸序列在重链的5′端处含有克隆位点(小写)、Kozak序列(大写,SEQ ID NO:1的核苷酸18-23)和前导序列(小写,SEQ ID NO:1的核苷酸24-86)。核苷酸序列的开放阅读框架是SEQ ID NO:1的核苷酸24—1433。

[0041] 图2是对编码在本文中称为维多珠单抗(vedolizumab)的人源化免疫球蛋白的轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:3)和轻链的推导氨基酸序列(SEQ ID NO:4)的说明。核苷酸序列在重链的5′端处含有克隆位点(小写)、Kozak序列(大写,SEQ ID NO:3的核苷酸18-23)和前导序列(小写,SEQ ID NO:3的核苷酸24-80)。核苷酸序列的开放阅读框架是SEQ ID NO:3的核苷酸24-737。

[0042] 图3是(A)在本文中称为维多珠单抗的人源化免疫球蛋白的成熟人源化轻链(SEQ ID NO:4的氨基酸20-238)与(B)在本文中称为LDP-02的人源化免疫球蛋白的成熟人源化轻链(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列比对。(关于LDP-02,参见WO98/06248和Feagan等,N.Eng.J.Med.352:2499-2507(2005)。Feagan等描述LDP-02的临床研究,但在所述文章中,其将LDP-02称为MLN02。)所述比对说明维多珠单抗与LDP-02的轻链氨基酸序列在成熟轻链的位置114和115处不同。

[0043] 图4是(A)同属人κ轻链恒定区(SEQ ID NO:6)与(B)同属鼠κ轻链恒定区(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列比对。氨基酸残基Thr和Val(其存在于成熟维多珠单抗轻链的位置114和115处(SEQ ID NO:4的氨基酸133和134))存在于人κ轻链的恒定区中,而氨基酸残基Ala和Asp(其存在于成熟LDP-02轻链(SEQ ID NO:5)的位置114和115处)存在于小鼠κ轻链的恒定区中。

[0044] 图5是载体pLKTOK38D(也称为pTOK38MLN02-TV)的图谱,所述载体编码MLN02的人源化重链和人源化轻链,且适于在CHO细胞中产生维多珠单抗。(参见公开pLKTOK38的美国

专利申请公布号2004/0033561A1。pLKTOK38D是pLKTOK38的变体，其中在图谱上指示的限制位点侧接编码轻链可变区的序列。)

[0045] 图6A显示单体百分比变化、聚集体百分比变化和抗α4β7冻干制剂的主要同工型百分比变化的预测模型。模型基于对实施例1中呈现的数据的统计分析。中心线显示预测模型的结果且外部线显示预测模型的95％置信区间。图6B显示当输入因子是pH、糖：蛋白质摩尔比和精氨酸：蛋白质摩尔比时，基于对来自表1-3的40℃数据的统计分析的替代性模型。中心线显示预测模型的结果且外部线显示预测模型的95％置信区间。

[0046] 图7显示(A)成熟人GM607’CL抗体κ轻链可变区和(B)人21/28’CL重链可变区的氨基酸序列。

[0047] 图8是显示固体和装载量影响干燥时间的图(线条中的数字代表干燥时间的分钟数)。

[0048] 图9是显示维多珠单抗相较于安慰剂对照不延迟实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的临床症状发作的图。那他珠单抗(natalizumab)相较于安慰剂对照显著($p<0.05$)延迟EAE的临床症状发作。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明是关于包含抗α4β7抗体的制剂。制剂可为包含非还原糖、抗α4β7抗体和一种或多种游离氨基酸的混合物，且非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比大于600摩尔非还原糖：1摩尔抗α4β7抗体。制剂可呈固体或液体形式。

[0051] 定义

[0052] 术语“医药制剂”是指一种含有呈使抗体的生物活性有效形式的抗α4β7抗体，且不含有对将施用制剂的受试者具有不可接受毒性的其它组分的制剂。

[0053] “稳定”制剂为当储存时其中的抗体实质上保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或其生物活性的制剂。在一个方面，制剂在储存时实质上保持其物理和化学稳定性以及其生物活性。一般基于制剂的预期存放期选择储存期。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本领域中可用且例如综述于Peptide and Protein Drug Delivery，247-301，Vincent Lee编，Marcel Dekker，Inc.，New York，N.Y.，Pubs.(1991)和Jones，A.Adv.Drug Delivery Rev.10:29-90(1993)中。

[0054] “脱酰胺”单克隆抗体是其一个或多个天冬酰胺或谷氨酰胺残基已经衍生化为例如天冬氨酸或异天冬氨酸的单克隆抗体。

[0055] “易经受脱酰胺”的抗体是包含一个或多个已发现有脱酰胺倾向的残基的抗体。

[0056] “易经受氧化”的抗体是包含一个或多个已发现有氧化倾向的残基的抗体。

[0057] “易经受聚集”的抗体是已发现其与其它抗体分子聚集(尤其在冷冻、加热、干燥、复原和/或搅拌时)的抗体。

[0058] “易经受片段化”的抗体是已发现例如在其铰链区处裂解成两个或更多个片段的抗体。

[0059] 就“减少脱酰胺、氧化、聚集或片段化”而言，其旨在指相对于在不同pH下或在不同缓冲剂中配制的单克隆抗体，防止脱酰胺、聚集或片段化或减少脱酰胺、聚集或片段化的量(例如至80％、60％、50％、40％、30％、20％或10％)。

[0060] “聚集体”、“SEC聚集体”或“可溶性聚集体”大于一个且小于或等于十个通过共价、

离子或疏水性相互作用缔合在一起以形成更大蛋白质体的抗体蛋白质和/或片段。

[0061] “不溶性聚集体”或“颗粒”大于十个通过共价、离子或疏水性相互作用缔合在一起以形成更大蛋白质体的抗体蛋白质和/或片段。

[0062] 如本文所用，单克隆抗体的“生物活性”是指抗体能够结合于抗原且产生可在体外或在体内测量的可测量生物反应。所述活性可为拮抗性或促效性。

[0063] 细胞表面分子“α4β7整合素”或“α4β7”是α_4链(CD49D，ITGA4)与β_7链(ITGB7)的杂二聚体。各链可与替代性整合素链形成杂二聚体以形成$\alpha_4\beta_1$或$\alpha_E\beta_7$。人α_4及β_7基因(分别为GenBank(National Center for Biotechnology Information，Bethesda，MD)RefSeq寄存编号NM_000885和NM_000889)由B和T淋巴细胞、特别是记忆CD4+淋巴细胞表达。作为许多整合素的典型，α4β7可以静止或活化状态存在。α4β7的配体包括血管细胞粘着分子(VCAM)、纤维结合蛋白(fibronectin)和粘膜地址素(MAdCAM(例如MAdCAM—1))。

[0064] 如本文所用，“对α4β7复合物具有结合特异性”的人免疫球蛋白或其抗原结合片段结合于α4β7，但不结合于α4β1或αEB7。

[0065] 如本文所用，“等张”制剂具有与人血液实质上相同的渗透压。等张制剂将通常具有约250mOsm至350mOsm的渗透压。可使用例如蒸气压或冰冻型渗压计来测量等张性。

[0066] 如本文所用，“缓冲剂”是指通过其酸碱共轭组分的作用抵抗pH变化的缓冲剂。缓冲剂可存在于本发明的液体或固体制剂中。缓冲剂将制剂的pH调节至约5.0至约7.5、约5.5至约7.5、约6.0至约6.5，或pH约6.3。在一个方面，将控制pH在5.0至7.5范围内的缓冲剂的实例包括乙酸盐、丁二酸盐、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐、磷酸盐、顺丁烯二酸盐、二甲基胂酸盐、2-[N-吗啉基]乙烷磺酸(MES)、双(2-羟乙基)亚氨基三[羟甲基]甲烷(Bis-Tris)、N-[2-乙酰胺基]-2-亚氨基二乙酸(ADA)、甘氨酰甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。在另一方面，本文中的缓冲剂是组氨酸或柠檬酸盐。

[0067] “组氨酸缓冲液”是包含组氨酸离子的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸氯化物、组氨酸乙酸盐、组氨酸磷酸盐、组氨酸硫酸盐溶液。组氨酸缓冲液或组氨酸盐酸盐缓冲液的pH在约pH5.5至6.5之间、在约pH6.1至6.5之间或是约pH6.3。

[0068] 在本文中，“糖”是具有通式$(CH_2O)_n$的化合物及其衍生物，包括单糖、双糖、三糖、多糖、糖醇、还原糖、非还原糖等。在一个方面，本文中的糖的实例包括葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麦芽糖、聚葡萄糖、赤藻糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇(sylitol)、山梨糖醇、甘露糖醇、蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、麦芽糖、乳酮糖、麦芽酮糖、葡萄糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、异麦芽酮糖等。糖可为冻干保护剂。在另一方面，本文中的糖是非还原双糖，如蔗糖。

[0069] 在本文中，“表面活性剂”是指降低液体表面张力的试剂。表面活性剂可为非离子表面活性剂。在一个方面，本文中的表面活性剂的实例包括聚山梨醇酯(聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯，例如聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80)；TRITON(叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇，非离子清洁剂，Dow Chemical Co.，Midland MI的Union Carbide子公司)；十二烷基硫酸钠(SDS)；月桂硫酸钠；辛基糖苷钠；月桂基磺基甜菜碱、肉豆蔻基磺基甜菜碱、亚油烯基(linoleyl)磺基甜菜碱或硬脂酰基磺基甜菜碱；月桂基肌氨酸、肉豆蔻基肌氨酸、亚油烯基肌氨酸或硬脂酰基肌氨酸；亚油烯基甜菜碱、肉豆蔻基甜菜碱或鲸蜡基甜菜碱；月桂酰胺丙基甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱、亚油酰胺丙基甜菜碱、肉豆蔻酰胺丙基甜菜碱、棕榈酰胺

丙基(palmidopropyl)甜菜碱或异硬脂酰胺丙基甜菜碱(例如月桂酰胺丙基甜菜碱);肉豆蔻酰胺丙基二甲胺、棕榈酰胺丙基二甲胺或异硬脂酰胺丙基二甲胺;甲基椰油酰基牛磺酸钠或甲基油烯基牛磺酸二钠;脱水山梨糖醇单棕榈酸酯;以及MONAQUAT系列(Mona Industries,Inc.,Paterson,N.J.);聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)和聚氧乙烯与聚氧丙烯二醇的共聚物(例如泊洛尼克(Pluronic)/泊洛沙姆、PF68等);等。在另一方面,表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0070] 本文中的术语"抗体"以最广泛意义使用且明确涵盖全长单克隆抗体、免疫球蛋白、多克隆抗体、由至少两种例如各自针对不同抗原或表位的全长抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)以及个别抗原结合片段(包括dAb、scFv、Fab、F(ab)′2、Fab′),包括人、人源化和来自非人物种及重组抗原结合形式的抗体,如微型单功能抗体(monobody)和微型双功能抗体。

[0071] 根据设想抗体的近似分子量为约150,000道尔顿(dalton)来计算本文所述的抗α4β7抗体与其它赋形剂的摩尔量和摩尔比。实际抗体分子量可不为150,000道尔顿,视氨基酸组成或翻译后修饰(例如如取决于用于表达抗体的细胞系)而定。实际抗体分子量可为150,000道尔顿的+/-5%。

[0072] 术语"人抗体"包括具有源于人生殖系免疫球蛋白序列的序列的抗体,如源于具有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠(例如XENOMOUSE基因工程改造小鼠(Abgenix,Fremont,CA)、HUMAB-MOUSE® 、KIRIN TC MOUSETM转染色体小鼠、KMMOUSE®(MEDAREX,Princeton,NJ))、人噬菌体显示库、人骨髓瘤细胞或人B细胞的抗体。

[0073] 本文所用的术语"单克隆抗体"是指由实质上均质抗体的群体获得的抗体,即除可在产生单克隆抗体期间出现的可能变体(所述变体一般以少量存在)之外,构成所述群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,各单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。修饰语"单克隆"指示抗体是从实质上均质的抗体群体获得的特性,且不应解释为需要通过任何特定方法来产生所述抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可通过最初由Kohler等,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法制备,或可通过重组DNA方法(参见例如美国专利号4,816,567)制备。"单克隆抗体"也可使用例如Clackson等,Nature,352:624-628(1991)和Marks等,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)中描述的技术从噬菌体抗体库分离。

[0074] 本文中的单克隆抗体明确包括"嵌合"抗体,其中一部分重链和/或轻链与源于特定物种或属于特定抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源,而所述链的剩余部分与源于另一物种或属于另一抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源;以及所述抗体的片段,只要其展现所需生物活性即可(美国专利号4,816,567;和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。本文中的相关嵌合抗体包括包含源于非人灵长类动物(例如旧世界猴(Old World Monkey)、猿(Ape)等)的可变域抗原结合序列和人恒定区序列的"灵长类化"抗体。

[0075] 在本发明的制剂中的所制备人源化免疫球蛋白的"抗原结合片段"至少包含抗α4β7抗体的重链和/或轻链的可变区。例如,维多珠单抗的抗原结合片段包含人源化轻链序列SEQ ID NO:4的氨基酸残基20至131。所述抗原结合片段的实例包括在本领域中已知的人源化免疫球蛋白的Fab片段、Fab′片段、scFv和F(ab′)2片段。本发明的人源化免疫球蛋白的抗

原结合片段可通过酶促裂解或通过重组技术来产生。例如，木瓜蛋白酶或胃蛋白酶裂解可分别用于产生Fab或F(ab′)$_2$片段。抗体也可使用已将一个或多个终止密码子引入天然终止位点上游的抗体基因以多种截短形式产生。例如，编码F(ab′)$_2$片段的重链的重组构建体可经设计以包括编码重链的CH_1结构域和铰链区的DNA序列。在一个方面，抗原结合片段抑制α4β7整合素结合于其一个或多个配体(例如粘膜地址素MAdCAM(例如MAdCAM—1)、纤维结合蛋白)。

[0076] 木瓜蛋白酶消化抗体会产生两个称为“Fab”片段的相同抗原结合片段，各自具有单一抗原结合位点；以及一剩余“Fc”片段，其名称反映其能够易于结晶。胃蛋白酶处理产生F(ab′)$_2$片段，其具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

[0077] “Fv”是由一个重链可变域和一个轻链可变域呈非共价缔合形式的二聚体组成的抗体片段。

[0078] Fab片段也含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab′片段因在重链CH1结构域的羧基端添加少量残基(包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸)而不同于Fab片段。Fab′-SH在本文中表示恒定域的半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的Fab′。F(ab′)$_2$抗体片段最初以之间具有铰链半胱氨酸的Fab′片段对形式产生。也已知抗体片段的其它化学偶联。

[0079] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域，其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一个方面，Fv多肽进一步在V_H结构域与V_L结构域之间包含使得scFv能够形成为抗原结合所需的结构的多肽连接子。关于scFv的综述，参见Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第113卷，Rosenburg和Moore编，Springer-Verlag，New York，第269页至第315页(1994)。

[0080] 术语“微型双功能抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段，所述片段包含与同一多肽链(V_H-V_L)中的可变轻域(V_L)连接的可变重域(V_H)。通过使用过短而无法使同一链上两个结构域之间配对的连接子，迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对且产生两个抗原结合位点。微型双功能抗体更充分描述于例如EP404,097；WO93/11161；和Hollinger等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，90：6444-6448(1993)中。

[0081] “全长抗体”是包含抗原结合可变区以及轻链恒定域(C_L)和重链恒定域C_{Hi}、C_{H2}及$C_{H\beta}$的抗体。恒定域可为天然序列恒定域(例如人天然序列恒定域)或其氨基酸序列变体。在一个方面，全长抗体具有一种或多种效应功能。

[0082] 本文中的“氨基酸序列变异”抗体是具有不同于主要种类抗体的氨基酸序列的抗体。通常，氨基酸序列变体将与主要种类抗体具有至少约70％、至少约80％、至少约85％、至少约90％或至少约95％同源性。氨基酸序列变体在主要种类抗体的氨基酸序列内或邻近于主要种类抗体的氨基酸序列的某些位置处具有取代、缺失和/或添加，但仍保留抗原结合活性。抗体的恒定区序列的变异对抗原结合活性的影响将比可变区的变异小。在可变区中，氨基酸序列变体将与主要种类抗体至少约90％同源、至少约95％同源、至少约97％同源、至少约98％同源或至少约99％同源。

[0083] “同源性”定义为在对准序列且必要时引入间隙以达成最大同源性百分比之后，在氨基酸序列变体中的相同残基的百分比。用于比对的方法和计算机程序在本领域中是熟知的。

[0084] “治疗性单克隆抗体”是用于人受试者疗法的抗体。本文中公开的治疗性单克隆抗体包括抗α4β7抗体。

[0085] 本文中的“糖基化变异”抗体是附接有一个或多个不同于一个或多个附接于主要种类抗体的碳水化合物部分的碳水化合物部分的抗体。本文中的糖基化变体的实例包括有G1或G2寡糖结构而非G0寡糖结构附接于其Fc区的抗体，有一或两种碳水化合物部分附接于其一个或两个轻链的抗体；无碳水化合物附接于抗体的一个或两个重链的抗体等；及糖基化变化的组合。

[0086] 抗体“效应功能”是指可归因于抗体Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变异Fc区)的那些生物活性。抗体效应功能的实例包括：C1q结合；补体依赖性细胞毒性；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体(例如B细胞受体；BCR)的下调等。

[0087] 视全长抗体的重链的恒定域的氨基酸序列而定，可将全长抗体指定为不同“类别”。存在五种主要类别的全长抗体：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，且这些类别中的若干种可进一步细分为“子类”(同种型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于抗体的不同类别的重链恒定域分别称为α、δ、ε、γ和μ。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是熟知的。

[0088] 来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”可基于其恒定域的氨基酸序列指定为两种明显不同类型(称为κ及λ)中的一者。

[0089] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应，其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀手(Natural Killer，NK)细胞、嗜中性白细胞和巨噬细胞)识别目标细胞上的结合抗体且随后导致目标细胞溶解。用于介导ADCC的原代细胞(NK细胞)仅表达FcγRIII，而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。FcR在造血细胞上的表达概述于Ravetch和Kinet，Annu.Rev.Immunol 9:457-92(1991)的第464页上的表3中。为了评估相关分子的ADCC活性，可进行体外ADCC测定，如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述的测定。适用于所述测定的效应细胞包括外周血液单核细胞(PBMC)和天然杀手(NK)细胞。或者或另外，可例如在如Clynes等，PNAS(USA)95:652-656(1998)中公开的动物模型中体内评估相关分子的ADCC活性。

[0090] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述结合于抗体Fc区的受体。在一个方面，FcR是天然序列人FcR。在另一方面，FcR为结合IgG抗体的受体(γ受体)且包括FcγRI、FcγRII及FcγRIII子类的受体，包括这些受体的对偶基因变体和可变剪接形式。FcγRII受体包括FcγRIIA(“活化受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”)，所述受体具有主要在其细胞质域方面不同的类似氨基酸序列。活化受体FcγRIIA在其细胞质域中含有免疫受体酪氨酸基活化基元(ITAM)。抑制受体FcγRIIB在其细胞质域中含有免疫受体酪氨酸基抑制基元(ITIM)。(参见M.Daeron，Annu.Rev.Immunol.15:203—234(1997)中的综述)。FcR综述于Ravetch和Kinet，Annu.Rev.Immunol9:457-92(1991)；Capel等，Immunomethods4:25—34(1994)；以及de Haas等，J.Lab.Clin.Med.126:33-41(1995)中。本文中的术语“FcR”涵盖其它FcR，包括将来待鉴定的FcR。所述术语也包括新生儿受体FcRn，其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等，J.Immunol.117:587(1976)及Kim等，J.Immunol.24:249(1994))。

[0091] 术语“高变区”当在本文中使用时是指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区

通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))和/或来自“高变环”的那些残基(例如轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变域中的26-32(H1)、53—55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901—917(1987))。“框架区”或“FR”残基是除如本文定义的高变区残基外的那些可变域残基。可将高变区或其CDR从一个抗体链转移至另一抗体链或至另一蛋白质以赋予所得(复合)抗体或结合蛋白以抗原结合特异性。

[0092] “人源化”形式的非人(例如啮齿动物)抗体是含有源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。人源化抗体大部分是人免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者的高变区的残基经来自如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的非人物种(供体抗体)的高变区的具有所需特异性、亲和力和能力的残基置换。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基经相应非人残基置换。此外,人源化抗体可包含未见于接受者抗体或供体抗体中的残基。进行这些修饰以进一步提高抗体效能。一般而言,人源化抗体将包含实质上所有至少一个且通常两个可变域,其中所有或实质上所有高变环都对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或实质上所有FR都是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。更多细节参见Jones等,Nature321:522-525(1986);Riechmann等,Nature332:323—329(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593—596(1992)。

[0093] “亲和力成熟”抗体是相较于不具有变化的亲本抗体,在其一个或多个高变区中具有一个或多个导致抗体对抗原的亲和力提高的变化的抗体。在一个方面,亲和力成熟抗体将对目标抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔亲和力。亲和力成熟抗体是通过本领域中已知的程序制备。Marks等,Bio/Technology10:779-783(1992)描述通过VH和VL结构域改组达成亲和力成熟。对CDR和/或框架残基的随机突变诱发由以下文献描述:Barbas等,Proc Nat.Acad.Sci,USA91:3809-3813(1994);Schier等,Gene169:147-155(1995);Yelton等,J.Immunol.155:1994-2004(1995);Jackson等,J.Immunol.154(7):3310-9(1995);以及Hawkins等,J.Mol.Biol.226:889-896(1992)。

[0094] “分离的”抗体是已经鉴定且与其天然环境的组分分离和/或从其天然环境的组分回收的抗体。在某些实施方案中,抗体将:(1)被纯化至如通过劳立法(Lowry method)所测定大于95重量%蛋白质且或者大于99重量%;(2)被纯化至足以通过使用旋杯式测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)通过使用考马斯蓝(Coomassie blue)或银染色法,在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE被纯化至均质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常将通过至少一个纯化步骤来制备分离的抗体。

[0095] “治疗”是指治疗性治疗与防治性或预防性措施两者。需要治疗者包括已患有疾病者以及待预防疾病或其复发者。因此,本文中待治疗的患者可已诊断为患有疾病或可能易患或易感疾病。术语“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0096] 配制的抗体是实质上纯净的且宜为实质上均质的(即不含污染性蛋白质等)。“实

质上纯净”抗体意谓以组合物中的蛋白质的总重量计，包含至少约90重量％、至少约95重量％或97重量％抗体的组合物。“实质上均质”抗体意谓包含蛋白质的组合物，其中以蛋白质的总重量计，至少约99重量％蛋白质是特定抗体，例如抗α4β7抗体。

[0097] 如本文关于溃疡性结肠炎受试者所用的“临床缓解”是指完全Mayo计分为2分或小于2分且无个别子计分大于1点。克罗恩氏病“临床缓解”是指CDAI计分为150分或小于150分。

[0098] 如本文关于溃疡性结肠炎受试者所用的“临床反应”是指完全Mayo计分降低3分或3分以上及从基线降低30％(或若在随访时未进行完全Mayo计分，则部分Mayo计分降低2分或2分以上及从基线降低25％或25％以上)，伴有直肠出血子计分降低1分或1分以上或绝对直肠出血计分降低1分或1分以下。如本文关于克罗恩氏病受试者所用的“临床反应”是指CDAI计分从基线(第0周)降低70分或70分以上。

[0099] 如本文关于溃疡性结肠炎受试者所用的“粘膜愈合”是指内窥镜子计分为1分或1分以下。

[0100] 如本文所用，“治疗失败”是指疾病恶化、需要急救药物或手术介入来治疗溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。急救药物是为治疗新型或未分型溃疡性结肠炎或克罗恩氏病症状所需的任何新颖药物或基线药物剂量的任何增加(除用于控制慢性腹泻的止泻药以外)。

[0101] 制剂

[0102] 如本文所述，已发现抗α4β7抗体在呈具有过量(以摩尔计)非还原糖的干燥(例如冻干)制剂形式时高度稳定。具体而言，非还原糖与抗α4β7抗体的比率(摩尔:摩尔)大于600:1的冻干制剂在本文中显示稳定至少2年。

[0103] 在第一方面，本发明提供一种稳定抗α4β7抗体制剂。在一个方面，制剂包含缓冲剂、至少一种稳定剂和抗α4β7抗体。在一个方面，干燥制剂包含一种或多种非还原糖和抗α4β7抗体，其中非还原糖与抗α4β7抗体的比率(摩尔:摩尔)大于600:1。制剂也包含一种或多种游离氨基酸。一种或多种氨基酸也可充当缓冲剂。在一个方面，一种或多种氨基酸可充当稳定剂。制剂可任选进一步包含至少一种表面活性剂。在一个实施方案中，制剂是干燥的，例如冻干的。制剂中的抗体可为全长抗体或其抗原结合片段，如Fab、Fv、scFv、Fab′或$F(ab')_2$片段。

[0104] 制剂可含有任何所需非还原糖。在一个方面，可包括于制剂中的非还原糖包括例如甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、聚葡萄糖、麦芽糖醇、乳糖醇、异麦芽酮糖、帕拉金糖醇(palatinit)及其组合。在另一方面，非还原糖是蔗糖、海藻糖、甘露糖醇和山梨糖醇。制剂中的非还原糖的绝对量不关键，但非还原糖与抗α4β7抗体的比率(摩尔:摩尔)大于400:1。在另一方面，非还原糖与抗α4β7抗体的比率(摩尔:摩尔)是至少约600:1、至少约625:1、至少约650:1、至少约675:1、至少约700:1、至少约750:1、至少约800:1、至少约1000:1、至少约1200:1、至少约1400:1、至少约1500:1、至少约1600:1、至少约1700:1、至少约1800:1、至少约1900:1或至少约2000:1。通常，合乎需要的是非还原糖以减少液体制剂中的可溶性聚集体形成(如发生在冷冻和解冻和/或干燥和复原时的聚集体形成)的量存在。非还原糖与抗α4β7抗体的比率(摩尔:摩尔)高于约730:1可能使得冻干状态下的可溶性聚集体形成略微减少。糖:蛋白质重量比可大于1.5:1(w/w)。在另一方面，液体(例如干燥前或复原后)制剂的非还原糖浓度在约10mM至约1M范围内，例如约60mM至约

600mM、约100mM至约450mM、约200mM至约350mM、约250mM至约325mM、以及约275mM至约300mM。在另一方面，干燥(例如冻干)制剂中的非还原糖的量在约40％至约70％(基于干燥制剂的重量比(w/w))范围内。在另一方面，干燥(例如冻干)制剂中的非还原糖的量在约40％至约60％、约45％至约55％范围内或是约51％(w/w)。在其它方面，当干燥制剂中的蛋白质量是约31％(基于干燥制剂的重量比)或非还原糖与蛋白质的质量比大于约1.6:1时，干燥(例如冻干)制剂中的非还原糖的量大于约51％(基于干燥制剂的重量比)。在另一方面，蔗糖是用于制剂中的非还原糖。

[0105] 制剂可含有任何所需游离氨基酸，其可呈L型、D型或这些形式的任何所需混合物。在一个方面，可包括于制剂中的游离氨基酸包括例如组氨酸、丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、丝氨酸、赖氨酸、色氨酸、缬氨酸、半胱氨酸及其组合。一些氨基酸可例如通过氢键、盐桥、抗氧化性质或疏水性相互作用或通过从蛋白质表面排除而在制造、干燥、冻干和/或储存期间稳定化蛋白质免遭降解。氨基酸可充当张力调节剂或可用于降低制剂粘度。在另一方面，游离氨基酸(如组氨酸和精氨酸)可充当低温保护剂和冻干保护剂，且当冻干为制剂的组分时不结晶。单独或呈组合形式的游离氨基酸(如谷氨酸和组氨酸)可充当pH在5至7.5范围内的水溶液中的缓冲剂。在另一方面，制剂含有组氨酸、或组氨酸和精氨酸。在另一方面，液体制剂的游离氨基酸浓度在约10mM至约0.5M范围内，例如约15mM至约300mM、约20mM至约200mM、或约25mM至约150mM、约50mM或约125mM。在另一方面，干燥(例如冻干)制剂中的组氨酸的量在约1％至约10％(基于干燥制剂的重量比)或约3％至约6％(w/w)范围内。在一些实施方案中，当干燥制剂中的蛋白质量是约31％(基于干燥制剂的重量比)或组氨酸与蛋白质的质量比大于约0.15:1时，干燥(例如冻干)制剂中的组氨酸的量大于约4％(基于干燥制剂的重量比)。在另一方面，干燥(例如冻干)制剂中的精氨酸的量在约4％至约20％(基于干燥制剂的重量比)或约10％至约15％(w/w)范围内。在一些实施方案中，当干燥制剂中的蛋白质量是约31％(基于干燥制剂的重量比)或精氨酸与蛋白质的质量比大于约0.4:1时，干燥(例如冻干)制剂中的精氨酸的量大于约13％(基于干燥制剂的重量比)。在氨基酸(如组氨酸和精氨酸)的组合的实施方案中，总氨基酸与抗体的摩尔比可为至少200:1、约200:1至约500:1、或至少400:1。

[0106] 制剂可任选进一步含有至少一种表面活性剂。在一个方面，可包括于制剂中的表面活性剂包括例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆(Pluronic®)及其组合。当存在时，表面活性剂通常以减少例如在装瓶、冷冻、干燥、冻干和/或复原期间不溶性抗体聚集体形成的量包括在内。例如干燥前(例如冻干)或复原后制剂中的表面活性剂浓度通常是约0.0001％至约1.0％、约0.01％至约0.1％，例如约0.02％、0.03％、0.04％、0.05％、0.06％、0.07％、0.08，％或0.09％(w/v)、0.05％至0.07％或0.06％(w/v)。例如干燥(例如冻干)制剂中的表面活性剂量通常是约0.01％至约3.0％(w/w)、约0.10％至约1.0％，例如约0.15％、0.20％、0.25％、0.30％、0.35％、0.40％或0.50％(w/w)。在另一方面，表面活性剂:抗体摩尔比是约1:1。抗α4β7抗体可以任何所需量存在于制剂中，前提是非还原糖与抗α4β7抗体的比率(摩尔:摩尔)大于约600:1。然而，制剂可含有高浓度的抗α4β7抗体。例如，液体制剂可包含至少约10mg/ml、至少约20mg/ml、至少约30mg/ml、至少约40mg/ml、至少约50mg/ml、至少约60ml/ml、至少约70mg/ml、至少约80mg/ml、至少约90mg/ml、至少约100mg/ml、约40mg/ml至约80mg/ml抗α4β7抗体、约60mg/ml抗α4β7抗体。干燥制剂(例如冻干制剂)可含有

至少约5重量%、至少约10重量%、至少约15重量%、至少约20重量%、至少约25重量%、至少约30重量%或约31重量%或约32重量%抗α4β7抗体。

[0107] 必要时，制剂可进一步包含金属螯合剂和/或抗氧化剂以及其它药学上可接受的赋形剂。适合金属螯合剂包括例如甲胺、乙二胺、去铁胺、曲恩汀(trientine)、组氨酸、苹果酸盐、膦酸酯化合物(例如依替膦酸(etidronic acid))、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)等。适合抗氧化剂包括例如柠檬酸、尿酸、抗坏血酸、硫辛酸、谷胱甘肽、生育酚、胡萝卜素、西红柿红素、半胱氨酸等。

[0108] 制剂可为液体或固体。液体制剂可为在适合水性溶剂(如水)或水性/有机混合物(如水醇混合物)中制备的水溶液或悬浮液。液体制剂的pH可介于约5.5与约7.5之间、约6.0与约7.0之间、或约6.0与约6.5之间，如为约6.0、6.1、6.2、6.3、6.4或6.5。液体制剂可冷藏(例如2℃至8℃)或冷冻(例如在-20℃或-80℃)以达成储存。固体制剂可以任何适合方法制备且可例如呈例如饼或粉末形式。通过干燥如本文所述的液体制剂(例如通过冻干、喷雾干燥、以薄膜形式(例如对于经皮递送)空气干燥、混合成脂质乳液且对于口服递送干燥成球形或对于经皮递送干燥成薄膜)来制备固体制剂。当制剂为固体制剂时，制剂的水分含量可不超过约5%、不超过约4.5%、不超过约4%、不超过约3.5%、不超过约3%、不超过约2.5%、不超过约2%、不超过约1.5%、不超过约1%，或为实质上无水的。可将固体制剂溶解(即复原)于适合介质或溶剂中以变为适于施用的液体。适用于复原固体制剂的溶剂包括水、等张生理盐水、缓冲液(例如磷酸盐缓冲生理盐水)、林格氏(Ringer's)(乳酸盐或右旋糖)溶液、最低必需培养基、醇/水溶液、右旋糖溶液等。溶剂的量可导致治疗性蛋白质浓度与干燥前浓度相比更高、相同或更低。在一个方面，复原的抗α4β7抗体浓度与干燥前液体制剂中的浓度相同。

[0109] 制剂可为无菌的，且此可在制备制剂之前或之后根据本领域技术人员已知用于产生适于向人受试者施用的无菌医药制剂的程序来达成。制剂可例如在干燥之前和/或复原之后，通过经小孔隙过滤、通过无菌处理或通过暴露于紫外辐射以液体形式来灭菌。过滤器孔隙尺寸可为0.1μm或0.2μm以过滤微生物或为10nm至20nm以过滤病毒颗粒。或者或另外，干燥制剂可例如通过暴露于γ辐射来灭菌。在一个方面，抗α4β7抗体液体制剂是通过在干燥之前过滤来灭菌。

[0110] 在一个方面，制剂在储存时是稳定的。在另一方面，制剂在以干燥状态储存时是稳定的。可通过评估制剂中的抗体在配制时以及在指示温度下储存之后的物理稳定性、化学稳定性和/或生物活性来测试稳定性。可以多种不同方法定性和/或定量评估液体制剂或复原干燥粉末的物理和/或化学稳定性(参见例如Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development,Rodriguez-Diaz等编,Informa Healthcare(2005))，包括评估聚集体形成(例如使用尺寸排阻(或凝胶过滤)色谱法(SEC)、基质辅助激光脱附离子化飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)、分析性超速离心、光散射(光子相关光谱法、动态光散射(DLS)、多角激光光散射(MALLS))、基于流动的显微镜成像、电子阻抗(库尔特(coulter))计数、光遮蔽或其它液体颗粒计数系统、通过测量混浊度、通过密度梯度离心和/或通过目视检查)；通过使用阳离子交换色谱(也参见Vlasak和Ionescu,Curr.Pharm.Biotechnol.9:468-481(2008)以及Harris等,J.Chromatogr.BBiomed.Sci.Appl.752:233—245(2001))、等电聚焦(IEF)(例如毛细管技术(cIEF))或毛细管带电泳评估电荷非均匀性；氨基端或羧

基端序列分析;质谱分析;SDS-PAGE或SEC分析以比较片段化、完整和多聚(即二聚、三聚等)抗体;肽图(例如胰蛋白酶或LYS-等);评估抗体的生物活性或抗原结合功能等。可使用熟练从业者可用的多种技术来评估生物活性或抗原结合功能(例如抗α4β7抗体与MAdCAM(例如MAdCAM—1)的结合或抑制表达α4β7整合素的细胞与MAdCAM(例如MAdCAM—1)(例如固定MAdCAM(例如MAdCAM—1))的结合)(参见例如Soler等,J.Pharmacol.Exper.Ther.330:864-875(2009))。

[0111] 也可以多种不同方法定性和/或定量评估固态制剂的稳定性,所述方法包括直接测试,如通过X射线粉末衍射(XRPD)鉴定晶体结构;使用傅立叶转换红外光谱法(Fourier Transform Infrared Spectroscopy,FTIR)评估固态下的抗体结构;以及使用差示扫描热量测定(DSC,例如以评估变性)测量冻干固体中的热转变(熔融、玻璃化转变等);及间接测试,如通过卡尔费休(Karl Fisher)测试测量水分含量例如以外推通过水解所致的化学不稳定性的可能性。测量干燥制剂的水分含量可指示制剂将经受化学或物理降解的可能性,水分含量越高,降解越多。

[0112] 可在选定温度下持续选定时期测量稳定性。在一个方面,干燥(例如冻干)制剂在约40℃、75%RH下稳定至少约2-4周、至少约2个月、至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约12个月或至少约18个月。在另一方面,制剂(液体或干燥(例如冻干))在约5℃和/或25℃和60%RH下稳定至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约12个月、至少约18个月、至少约24个月、至少约30个月、至少约36个月或至少约48个月。在另一方面,制剂(液体或干燥(例如冻干))在约-20℃下稳定至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约12个月、至少约18个月、至少约24个月、至少约30个月、至少约36个月、至少约42个月或至少约48个月。此外,在一些实施方案中,液体制剂可在冷冻(例如至-80℃)和解冻之后,例如像在1、2或3个冷冻和解冻循环之后稳定。

[0113] 不稳定性可包括以下任何一者或多者:聚集(例如非共价可溶性聚集(由疏水性或电荷相互作用引起)、共价可溶性聚集(例如二硫键重排/混杂)、不溶性聚集(由在液体/空气和液体/固体界面处的蛋白质变性引起))、脱酰胺(例如Asn脱酰胺)、氧化(例如Met氧化)、异构化(例如Asp异构化)、变性、截断/水解/片段化(例如铰链区片段化)、丁二酰亚胺形成、N端延长、C端加工、糖基化差异等。

[0114] 稳定制剂可促成抗α4β7抗体的低免疫原性。免疫原性抗α4β7抗体可导致人受试者或患者的人抗人抗体(HAHA)反应。对抗α4β7抗体显现HAHA反应的患者在治疗时可具有不利事件(例如部位输注反应)或可快速消除抗α4β7抗体,从而导致剂量低于治疗所计划的剂量。对抗α4β7抗体治疗的早期研究的报道(Feagen等(2005)N.Engl.J.Med.352:2499-2507)指示截至第8周在44%治疗患者中产生人抗人抗体。此研究中的抗体是以液体形式储存且不含有任何聚山梨醇酯。

[0115] 在一些实施方案中,相较于稳定性较小的制剂的HAHA结果,制剂可使HAHA阴性患者的比例增加至患者的至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0116] 在一些实施方案中,抗α4β7抗体制剂具有≥50%主要带电荷同工型、≥55%主要带电荷同工型或65%至70%主要带电荷同工型。在其它方面,稳定抗α4β7抗体制剂具有≤45%酸性带电荷同工型、≤40%酸性带电荷同工型、≤30%酸性带电荷同工型或22%至28%酸性同工型。在其它方面,稳定抗α4β7抗体制剂具有≤25%碱性同工型、≤20%碱性同

工型、≤15%碱性同工型、约5%碱性同工型或约10%碱性同工型。在一个方面，例如如通过CEX所测定，稳定抗α4β7抗体制剂具有≥55%主要同工型、≤30%酸性同工型和/或≤20%碱性同工型。在另一方面，例如如通过cIEF所测定，稳定抗α4β7抗体制剂具有≥50%主要同工型、<45%酸性同工型和/或<10%碱性同工型。

[0117] 在一些方面，抗α4β7抗体干燥固体制剂具有≤10%水分含量、≤5%水分含量或<2.5%水分含量。复原所需时间≤60分钟、≤50分钟或≤40分钟或≤30分钟或≤20分钟。

[0118] 可通过SEC、MALDI-TOF MS、分析性超速离心、光散射(DLS或MALLS)或纳米尺寸测量(如纳米粒子径迹分析NTA，NanoSight Ltd，Wiltshire，UK)来测量即液体制剂或复原后干燥制剂中的单体含量和/或聚集体含量(例如呈二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、低聚物和更高级聚集体形式)。可以许多方法达成聚集体的解析、表征和定量，所述方法包括例如通过较长管柱或通过连续附接第二或更多SEC管柱与初始分析SEC管柱串联来增加SEC管柱分离的长度；用光散射补充SEC对单体的定量；或通过使用NTA。

[0119] 在一个实施方案中，抗α4β7抗体制剂具有≥90%单体抗体、≥95%单体抗体或97%至99%单体抗体。在另一实施方案中，抗α4β7抗体制剂中的大部分物质的平均半径≤20nm、≤15nm、≤10nm，或为约5nm至约7nm。在一个方面，根据蛋白质分析，抗α4β7抗体制剂具有≥80%量的重链加轻链。在一个方面，存在≥90%重链加轻链。在另一方面，抗α4β7抗体制剂具有≤10%聚集体、≤5%聚集体、≤2.5%聚集体、≤1.5%聚集体、≤1.0%聚集体或≤0.5%聚集体。在另一方面，稳定抗α4β7抗体制剂具有≥96%单体和/或≤2.5%聚集体。在另一方面，稳定抗α4β7抗体制剂具有约99%单体和/或约<1%聚集体。

[0120] 可通过光遮蔽(例如Hach Ultra Analytics(Grants Pass，OR)的液体颗粒计数系统(HIAC))、显微法、库尔特计数器或基于数字(例如基于流动)显微镜成像的系统(如Brightwell(Ottawa，CA)的微流体(microfluidics)成像(MFI)或Fluid Imaging Technologies(Yarmouth，ME)的FLOWCAM®Image颗粒分析仪)来测量即复原制剂中的例如聚集体或未溶解赋形剂的粒度。在一个方面，抗α4β7抗体制剂中的粒度是约30μm、约25μm、约10μm、约5μm、约2μm或1μm或1μm以下。应将抗体制剂中的颗粒的量减至最少。在一个方面，在一个剂量中，抗α4β7抗体制剂具有小于6000个直径≥10μm的颗粒以及小于600个直径≥25μm的颗粒(美国药典(U.S.Pharmacopoeia)第788章，光遮蔽计数法；一半那些量是通过显微镜定量法测定)。在另一方面，例如通过MFI测量，在一个剂量的抗α4β7抗体制剂(例如复原制剂)中，每毫升的颗粒量是每毫升约500个至约2000个或约1000个至约3000个2-10μm颗粒、每毫升约50个至约350个≥10μm颗粒和每毫升约0个至约50个≥25μm颗粒。

[0121] 在一个实施方案中，抗α4β7抗体制剂的结合亲和力是参考标准抗α4β7抗体的约60%至约140%。在一个方面，本文所述的制剂中的抗α4β7抗体以参考标准的约80%至约120%的值结合于例如于细胞上的α4β7(WO98/06248或美国专利号7,147,851)。在另一实施方案中，抗α4β7抗体制剂能够抑制表达α4β7整合素的细胞与MAdCAM(例如MAdCAM—1)(MAdCAM-Ig嵌合体)的结合至少50%或至少60%(参见美国专利申请公布号20070122404，也参考标准实施例)。

[0122] 如上所指示，在本文中明确涵盖将制剂冷冻。因此，可测试制剂在冷冻和解冻时的稳定性。因此，液体制剂中的抗体在冷冻和解冻制剂时可为稳定的，例如抗体在一个、两个、三个、四个、五个或五个以上冷冻/解冻循环之后可为稳定的。

[0123] 在一些实施方案中，制剂是包含至少约50mg/ml至约100mg/ml抗α4β7抗体、缓冲剂(例如组氨酸)和至少约9％(w/w)非还原糖(例如蔗糖、海藻糖或甘露糖醇)的液体制剂。在一个实施方案中，制剂包含至少约50至约80mg/ml、约60mg/ml抗α4β7抗体、缓冲剂(例如组氨酸)、游离氨基酸(例如精氨酸)和至少约9％或10％(w/w)非还原糖(例如蔗糖、海藻糖或甘露糖醇)。

[0124] 在另一实施方案中，制剂包含至少约60mg/ml抗α4β7抗体、缓冲剂(例如组氨酸)、游离氨基酸(例如精氨酸)和至少约10％(w/w)非还原糖(例如蔗糖、海藻糖或甘露糖醇)。在所述实施方案中，缓冲剂浓度是约15至约75mM、约25至约65mM、或约50mM。游离氨基酸浓度是约50至约250mM、约75至约200mM、约100至约150mM或约125mM。

[0125] 在一个实施方案中，制剂是包含非还原糖、抗α4β7抗体、组氨酸、精氨酸和聚山梨醇酯80的混合物的干燥固体制剂(例如冻干制剂)，且非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于600:1。

[0126] 在另一实施方案中，制剂是包含非还原糖、抗α4β7抗体、组氨酸、精氨酸和聚山梨醇酯80的混合物的干燥固体非晶制剂(例如冻干制剂)，且非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于600:1。

[0127] 在一个实施方案中，制剂是包含非还原糖、抗α4β7抗体、组氨酸、精氨酸和聚山梨醇酯80的冻干制剂，且制剂中非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于600:1。

[0128] 在一个实施方案中，制剂是包含非还原糖、抗α4β7抗体、组氨酸、精氨酸和聚山梨醇酯80的冻干制剂，其中制剂中非还原糖与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于600:1且制剂中精氨酸与抗α4β7抗体的摩尔比(摩尔:摩尔)大于250:1。

[0129] 在一个实施方案中，制剂是液体制剂且包含至少约60mg/ml抗α4β7抗体、至少约10％(w/v)非还原糖和至少约125mM一种或多种游离氨基酸。

[0130] 在一个实施方案中，制剂是液体制剂且包含至少约60mg/ml抗α4β7抗体、至少约10％(w/v)非还原糖和至少约175mM一种或多种游离氨基酸。

[0131] 在一个实施方案中，制剂是液体制剂且包含约60mg/ml至约80mg/ml之间的抗α4β7抗体、缓冲剂和至少约10％(w/w)糖。

[0132] 在一个实施方案中，制剂是液体制剂且包含约60mg/ml至约80mg/ml之间的抗α4β7抗体、组氨酸和至少约10％(w/w)蔗糖。

[0133] 在一个实施方案中，将制剂冻干且以单次剂量形式储存于一个小瓶中。小瓶合乎需要地储存于约2-8℃下直至将其向有需要的受试者施用。小瓶可例如是20cc或50cc小瓶(例如用于60mg/ml剂量)。小瓶可含有至少约120mg、至少约180mg、至少约240mg、至少约300mg、至少约360mg、至少约540mg或至少约900mg抗α4β7抗体。在一个方面，小瓶含有约300mg抗α4β7抗体。

[0134] 一种或多种其它药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(如Remington:The Science and Practice of Pharmacy，第21版，Hendrickson，R.编(2005)中所述者)可包括于制剂中，只要其不会不利影响制剂的所需特征即可。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒且包括其它缓冲剂;共溶剂;抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸;螯合剂，如EDTA;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);生物可降解聚合物，如聚酯;防腐剂;和/或成盐反离子，如钠。α4β7抗体

[0135] 适用于制剂中的抗α4β7抗体包括来自任何所需来源的抗体，如完全人抗体、鼠抗体、兔抗体等；及任何所需工程改造抗体，如嵌合抗体、人源化抗体等。这些类型抗体的任一者的抗原结合片段(如Fab、Fv、scFv、Fab′和F(ab′)$_2$片段)也适用于制剂中。

[0136] 抗α4β7抗体可结合于α4链(例如人源化MAb21.6(Bendig等，美国专利号5,840,299))、β7链(例如FIB504或人源化衍生物(例如Fong等，美国专利号7,528,236))上的表位，或结合于由α4链与β7链缔合所形成的组合表位。在一个方面，抗体结合α4β7复合物上的组合表位，但不结合α4链或β7链上的表位，除非所述链彼此缔合。α4整合素与β7整合素的缔合可例如通过引入存在于一起构成表位的两个链上的邻近残基或通过构象暴露一个链(例如α4整合素链或β7整合素链)上的在不存在适当整合素搭配物或不存在整合素活化下不可达成抗体结合的表位结合位点来产生组合表位。在另一方面，抗α4β7抗体结合α4整合素链与β7整合素链两者，且因此对于α4β7整合素复合物具有特异性。所述抗体可例如结合α4β7但不结合α4β1且/或不结合$\alpha_E\beta7$。在另一方面，抗α4β7抗体与Act—1抗体结合于相同或实质上相同表位(Lazarovits,A.I.等,J.Immunol.,133(4):1857-1862(1984);Schweighoffer等,J.Immunol.,151(2):717-729,1993;Bednarczyk等,J.Biol.Chem.,269(11):8348—8354,1994)。产生鼠Act—1单克隆抗体的鼠ACT—1杂交瘤细胞系是根据2001年8月22日的布达佩斯条约(Budapest Treaty)的规定，以Millennium Pharmaceuticals,Inc.,40Landsdowne Street,Cambridge,Mass.02139,U.S.A.名义以寄存编号PTA-3663存放于美国菌种保存中心(American Type Culture Collection),10801University Boulevard,Manassas,Va.20110-2209,U.S.A.。在另一方面，抗α4β7抗体是使用美国专利申请公布号2010/0254975中提供的CDR的人抗体或α4β7结合蛋白。

[0137] 在一个方面，抗α4β7抗体抑制α4β7与其一个或多个配体(例如粘膜地址素(例如MAdCAM(例如MAdCAM—1))、纤维结合蛋白和/或血管地址素(VCAM))结合。灵长类动物MAdCAM描述于PCT公布WO96/24673中，所述公布的全部教义以引用的方式并入本文。在另一方面，抗α4β7抗体抑制α4β7与MAdCAM(例如MAdCAM—1)和/或纤维结合蛋白结合而不抑制结合VCAM。

[0138] 在一个方面，适用于制剂中的抗α4β7抗体是小鼠Act—1抗体的人源化形式。适于制备人源化抗体的方法在本领域中是熟知的。一般而言，人源化抗α4β7抗体将含有包含小鼠Act-1抗体的3个重链互补决定区(CDR,CDR1,SEQ ID NO:8、CDR2,SEQ ID NO:9和CDR3,SEQ ID NO:10)和适合人重链框架区的重链；且也含有包含小鼠Act-1抗体的3个轻链CDR(CDR1,SEQ ID NO:11、CDR2,SEQ ID NO:12及CDR3,SEQ ID NO:13)和适合人轻链框架区的轻链。人源化Act—1抗体可含有具有或不具有氨基酸取代的任何适合人框架区，包括共有框架区。例如，一个或多个框架氨基酸可经另一氨基酸(如小鼠Act—1抗体中相应位置处的氨基酸)置换。若存在，则人恒定区或其部分可源于人抗体(包括对偶基因变体)的κ或λ轻链和/或γ(例如γ1、γ2、γ3、γ4)、μ、α(例如α1、α2)、δ或ε重链。可选择特定恒定区(例如IgG1)、其变体或部分以调整效应功能。例如，可将突变恒定区(变体)并入融合蛋白中以使与Fc受体的结合和/或固定补体的能力减至最小(参见例如Winter等,GB2,209,757B;Morrison等,WO89/07142;Morgan等,WO94/29351,1994年12月22日)。Act—1抗体的人源化形式描述于PCT公布号WO98/06248和WO07/61679中，其各自的全部教义以引用的方式并入本文。

[0139] 在另一方面，适用于制剂中的抗α4β7人源化抗体包含包括SEQ ID NO:2的氨基酸20至140的重链可变区；和包括SEQ ID NO:4的氨基酸20至131或SEQ ID NO:5的氨基酸21至132的轻链可变区。若需要，则可存在适合人恒定区。例如，人源化抗α4β7抗体可包含包括SEQ ID NO:2的氨基酸20至470的重链和包括SEQ ID NO:5的氨基酸21至239的轻链。在另一实施例中，人源化抗α4β7抗体可包含包括SEQ ID NO:2的氨基酸20至470的重链和包括SEQ ID NO:4的氨基酸20至238的轻链。图4显示比较人抗体与鼠抗体的同属轻链比对。所述比对说明两个小鼠残基转换为人残基的维多珠单抗(例如化学文摘社(Chemical Abstract Service，CAS，美国化学学会(American Chemical Society))登记编号943609-66-3)的人源化轻链比LDP-02的轻链(图3)更类人。此外，LDP-02具有轻微疏水性、可挠性丙氨酸114和亲水性位点(天冬氨酸115)，其在维多珠单抗中置换为轻微亲水性的含羟基苏氨酸114和疏水性的可能面向内部的缬氨酸115残基。

[0140] 抗体序列的其它取代可为例如重链和轻链框架区的突变，如SEQ ID NO:14的残基2上的异亮氨酸突变为缬氨酸；SEQ ID NO:14的残基4上的甲硫氨酸突变为缬氨酸；SEQ ID NO:15的残基24上的丙氨酸突变为甘氨酸；SEQ ID NO:15的残基38处的精氨酸突变为赖氨酸；SEQ ID NO:15的残基40处的丙氨酸突变为精氨酸；SEQ ID NO:15的残基48上的甲硫氨酸突变为异亮氨酸；SEQ ID NO:15的残基69上的异亮氨酸突变为亮氨酸；SEQ ID NO:15的残基71上的精氨酸突变为缬氨酸；SEQ ID NO:15的残基73上的苏氨酸突变为异亮氨酸；或其任何组合；及用小鼠Act—1抗体的CDR(CDR1，SEQ ID NO:8、CDR2，SEQ ID NO:9和CDR3，SEQ ID NO:10)置换重链CDR；以及用小鼠Act—1抗体的轻链CDR(CDR1，SEQ ID NO:11、CDR2，SEQ ID NO:12和CDR3，SEQ ID NO:13)置换轻链CDR。

[0141] 在一些实施方案中，用于制剂中的抗α4β7人源化抗体包含与SEQ ID NO:2的氨基酸20至140具有约95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的重链可变区，以及与SEQ ID NO:4的氨基酸20至131或SEQ ID NO:5的氨基酸21至132具有约95％、96％、97％、98％或99％序列一致性的轻链可变区。可使用缺省参数，使用适合序列比对算法(如Lasergene系统(DNASTAR，Inc.，Madison，Wis.))测定氨基酸序列一致性。在一个实施方案中，用于制剂中的抗α4β7抗体是维多珠单抗(CAS，美国化学学会，登记编号943609—66—3)。

[0142] 其它α4β7抗体也可用于本文所述的制剂和给药方案中。例如，以全文引用的方式并入本文的US2010/0254975(Amgen，Inc.)中描述的α4β7抗体适用于治疗个体的炎症性肠病的制剂和方法中。

[0143] 抗α4β7抗体可通过在活细胞(例如培养的细胞)中表达编码各链的核酸序列来产生。可利用多种宿主-表达载体系统来表达本发明的抗体分子。所述宿主-表达系统表示藉此相关编码序列可产生且随后纯化的载体，但也表示当用适当核苷酸编码序列转化或转染时可原位表达抗α4β7抗体的细胞。这些系统包括但不限于微生物，如用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘质粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌(E.coil)、枯草杆菌(B.subtilis))；用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酵母(Saccharomyces)、毕赤酵母(Pichia))；用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统；用重组病毒表达载体(例如花椰菜嵌纹病毒CaMV、烟草嵌纹病毒TMV)感染或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统；或具有含有源自哺乳动物细胞的基因组(例如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒

(例如腺病毒晚期启动子、痘疮病毒7.5K启动子)的启动子的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、3T3、NS0细胞)。例如,与载体(如来自人巨大细胞病毒的主要中早期基因启动子元件)联合的哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell,CHO))是抗体的有效表达系统(Foecking等,Gene45:101(1986);Cockett等,Bio/Technology8:2(1990))。

[0144] 在细菌系统中,许多表达载体宜视所表达的抗体分子的预期用途来选择。例如,当待产生大量所述蛋白质以产生抗体分子的医药组合物时,指导表达高含量的易于纯化的融合蛋白产物的载体可为合乎需要的。所述载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等,EMBO J.2:1791(1983)),其中抗体编码序列可个别地与lac Z编码区同框连接至载体中以便产生融合蛋白;pIN载体(Inouye和Inouye,Nucleic Acids Res.13:3101-3109(1985);Van Heeke和Schuster,J.Biol.Chem.24:5503-5509(1989))等。pGEX载体也可用于以与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白形式表达外来多肽。一般而言,所述融合蛋白是可溶性的,且可易于通过吸附及结合于基质谷胱甘肽-琼脂糖珠粒,随后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而从溶解细胞纯化。pGEX载体经设计以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位点以便可从GST部分释放克隆的目标基因产物。

[0145] 在一昆虫系统中,使用加洲苜蓿夜蛾核多角体病毒(Autographa califomica nuclear polyhedrosis virus,AcNPV)作为表达外来基因的载体。病毒生长于草地粘虫(Spodoptera frugiperda)细胞中。可将抗体编码序列个别地克隆至病毒的非必需区域(例如多角体蛋白基因)中且置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0146] 在哺乳动物宿主细胞中,可利用许多基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,相关抗体编码序列可连接至腺病毒转录/翻译控制复合物(例如晚期启动子和三联前导序列)。随后可通过体外或体内重组将此嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入病毒基因组的非必需区域(例如区域E1或E3)中将产生活的且能够在受感染宿主中表达抗体分子的重组病毒(例如参见Logan和Shenk,Proc.Natl.Acad.Sci.USA81:355—359(1984))。也可需要特定起始信号来有效翻译插入的抗体编码序列。这些信号包括ATG起始密码子和邻近序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框架同相以确保翻译全部插入物。这些外源翻译控制信号和起始密码子可具有多种来源,天然与合成两者均可。可通过包括适当转录增强子元件、转录终止子等来增强表达效率(参见Bittner等,Methods in Enzymol.153:51-544(1987))。

[0147] 此外,可选择调节插入序列的表达或以所需特定方式修饰并加工基因产物的宿主细胞株。对蛋白质产物的所述修饰(例如糖基化)和加工(例如裂解)就蛋白质功能而言可为重要的。不同宿主细胞具有翻译后加工和修饰蛋白质和基因产物的特征性及特定机制。可选择适当细胞系或宿主系统以确保对表达的外来蛋白质进行适当修饰和加工。为此目的,可使用具有用于适当加工初级转录物、糖基化及磷酸化基因产物的细胞机制的真核宿主细胞。所述哺乳动物宿主细胞包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)、NS0、HeLa、VERY、幼小仓鼠肾(BHK)、猴肾(COS)、MDCK、293、3T3、WI38、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)、乳癌细胞系(例如像BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D)以及正常乳腺细胞系(例如像CRL7030和Hs578Bst)。

[0148] 不同细胞类型的糖基化机制可产生糖基化组成不同于另一细胞类型或无糖基化(如在细菌细胞的情况下)的抗体。在一个方面,用于产生抗α4β7抗体的细胞类型是哺乳动

物细胞，如NS0或CHO细胞。在一个方面，哺乳动物细胞可包含缺失细胞代谢中涉及的酶，且相关外源基因可例如在用于例如通过转化或转染引入细胞中的构建体或载体中可操作地连接于置换酶。具有外源基因的构建体或载体赋予宿有构建体或载体的细胞以选择优势，从而促进产生由外源基因编码的多肽。在一个实施方案中，CHO细胞是DG44细胞(Chasin和Urlaub(1980)PNAS USA77:4216)，其包含缺失或不活化二氢叶酸还原酶基因。在另一实施方案中，CHO细胞是CHO K1细胞，其包含缺失或不活化谷氨酰胺合成酶基因(参见例如美国专利号5,122,464或5,827,739)。

[0149] 固体制剂

[0150] 本发明的固体制剂通常通过干燥液体制剂来制备。可使用任何适合干燥方法，如冻干或喷雾干燥。冻干涉及通常在将用于储存、运送和分配制剂的容器(例如小瓶)中冷冻液体制剂(参见例如Gatlin和Nail，Protein Purification Process Engineering，Roger G.Harrison编，Marcel Dekker Inc.，317-367(1994))。一旦冷冻制剂，即降低大气压且调节温度以允许例如通过升华移除冷冻溶剂。冻干过程的此步骤有时称为初级干燥。若需要，则随后可升高温度以通过蒸发移除仍结合于干燥制剂的任何溶剂。冻干过程的此步骤有时称为二级干燥。当制剂已达到所需干燥程度时，结束干燥过程且密封容器。最终固体制剂有时称为“冻干制剂”或“饼”。冻干过程可使用任何适合设备来进行。适合冻干设备可从许多商业来源(例如SP Scientific，Stone Ridge，NY)获得。

[0151] 可使用多种适合装置干燥液体制剂以产生固体(例如冻干)制剂。一般而言，本领域技术人员使用含有搁板的密封室制备冻干制剂，在所述搁板上置放含待干燥液体制剂的小瓶。可控制搁板的温度以及冷却和加热速率，也可控制腔室内压力。应了解，本文所论述的各种过程参数是指使用此类型装置进行的过程。若需要，则普通技术人员可轻易使本文所述的参数适于其它类型的干燥装置。

[0152] 普通技术人员可轻易测定适用于初级和二级干燥的温度和真空量。一般而言，制剂于约-30℃或小于-30℃的温度(如-40℃或-50℃)下冷冻。冷却速率可影响基质中冰晶的量和尺寸。初级干燥通常在比冷冻温度高约10℃、约20℃、约30℃、约40℃或约50℃的温度下进行。在一个方面，可设定初级干燥条件以维持抗α4β7抗体低于制剂的玻璃化转变温度或塌陷温度。高于塌陷温度时，非晶冷冻基质可流动(塌陷)，从而导致蛋白质分子可能不被刚性固体基质所包围，且蛋白质分子可在塌陷基质中不稳定。此外，若发生塌陷，则制剂可难以充分干燥。制剂中产生的较高水分量可导致蛋白质降解率较高及在冻干产物的质量削弱至不可接受水平之前其可储存的时间量减少。在一个方面，选择搁板温度和腔室压力以在初级干燥期间维持产物温度低于塌陷温度。冷冻制剂的玻璃化转变温度可通过本领域中已知的方法(例如通过差示扫描热量测定(DSC))来测量。塌陷温度可通过本领域中已知的方法(例如冷冻干燥显微法)来测量。非还原糖与蛋白质的比率(摩尔:摩尔)和其它制剂组分的量将影响玻璃化转变温度和塌陷温度。在一些实施方案中，α4β7抗体制剂的玻璃化转变温度是约-35℃至约-10℃、约-35℃至约-25℃、或约-35℃至约-29℃。在另一实施方案中，α4β7抗体制剂的玻璃化转变温度是约-29℃。在一些实施方案中，α4β7抗体制剂的玻璃化转变温度是约-30℃、约-31℃、约-32℃、约-33℃、约-34℃、约-35℃或约-36℃。在一些实施方案中，α4β7抗体制剂的塌陷温度是约-30℃至约0℃、约-28℃至约-25℃、或约-20℃至约-10℃。在另一实施方案中，α4β7抗体制剂的塌陷温度是约-26℃。在不希望受任何特定理

论束缚下，向上匀变速率越快，产物的塌陷温度越高。初级干燥步骤可移除至少50％、至少60％、至少70％或70％以上的溶剂。在一个方面，初级干燥步骤从抗α4β7抗体制剂移除大于80％的溶剂。

[0153] 初级干燥取决于搁板温度和压力。可凭经验确定在不同过程参数下进行冻干的初级干燥条件。初级干燥也可基于产物温度进行数学建模。传质和传热方程(Milton，等(1997)PDA J ofPharm Sci&Tech，51:7-16)与对Rp和Kv的了解相结合允许了解输入变量(包括过程输入变量(如搁板温度和压力))与用Rp值获取的制剂变量的组合和相互作用。这些模型可有助于基于塌陷温度和设备能力对产物温度的限制来确定待用于高效过程的参数。

[0154] $$\frac{dm}{dt}=\frac{A_p(P_o-P_c)}{R_p}$$ $$\ln P_0 = -6144.96/T_p + 24.0185$$

[0155] 方程1 方程2

[0156] $$\frac{dQ}{dt}=A_v K_v(T_s-T_p)$$ $$\frac{dQ}{dt}=\Delta H_s\frac{dm}{dt}$$

[0157] 方程3 方程4

[0158] 方程1使初级干燥期间的升华速率(dm/dt)与容器的内部横截面积(A_p)、冰的蒸气压(P_o)、腔室压力(P_c)以及饼和塞子的面积标准化传质阻力(R_p)相关联。在升华界面处的P_o可由方程2确定，其中使P_o与产物冰在升华界面处的温度相关联，所述温度是根据产物温度(T_p)的近似值，所述产物温度可用热电偶在小瓶底部测量或可当确定其它变量时由以上方程推导。方程3关联搁板至小瓶的传热速率，其中A_v是小瓶面积，K_v是小瓶的传热系数，T_s是搁板的温度，且T_p是产物温度。方程4结合了传热和传质方程，其中ΔH_s是升华热。

[0159] 如从初级干燥的方程所见，搁板温度(T_s)、产物温度(T_p)、腔室压力(P_c)、饼的传质阻力(R_p)和传热系数(K_v)可影响升华速率。

[0160] 在冷冻之后和在初级干燥之前的任选步骤是退火。在这个步骤中，冻干机的搁板温度升高至制剂的玻璃化转变温度以上持续较短时期，例如约2至6小时、约3至5小时、或约4小时，接着使搁板温度再次降低至制剂的玻璃化转变温度以下。退火可用于结晶增积剂并形成较大更均一冰晶。退火过程可影响复原时间，因为退火干燥饼的表面积高于未退火干燥饼。α4β7抗体制剂的退火步骤可在约-30℃至约-10℃℃或约-25℃℃至约-15℃下进行。在一个方面，α4β7抗体制剂的退火温度是约-20℃。

[0161] 二级干燥通常在温度高于液体制剂的冷冻温度下进行。例如，二级干燥可在约10℃、约20℃、约30℃、约40℃或约50℃下进行。在一个方面，二级干燥的温度是环境温度，例如20-30℃。二级干燥的时间应足以使水分量降低至<5％。

[0162] 在另一方面，冻干循环包括在约-45℃下冷冻、在约-20℃下退火、在约-45℃下再冰冻、在约-24℃和150mTorr下进行初级干燥，和在约27℃和150mTorr下进行二级干燥。

[0163] R_p受冷冻DP的固体含量和DP的热史(冷冻、退火和再冰冻阶段)影响，所述热史会影响饼的孔结构。热史也可影响二级干燥阶段，其中较大表面积可有助于水解吸(Pikal，等(1990)Int.J.Pharm.，60:203—217)。适用于在初级和二级冻干阶段期间进行控制的过程

参数可为干燥循环的各阶段期间的搁板温度和腔室压力。

[0164] 对于按比例扩大，冷冻干燥器装载量和固体含量可影响干燥循环。初级干燥时间可受制剂中的固体含量影响。在较高固体含量下，例如当总固体(赋形剂和/或蛋白质)浓度变化超过10w/v％或超过15w/v％，例如与干燥时间确定的制剂相比变化50％至100％时，干燥时间可受影响。例如，高固体含量制剂的干燥时间可长于低固体含量制剂。在一些实施方案中，冷冻干燥器能力的使用百分比可在约25％至约100％范围内。相较于较低装载％能力，在较高装载％能力下，初级干燥时间可增加多达2倍。在不同装载％下的初级干燥时间之间的差异随固体含量增加而增加。在一个实施方案中，固体含量小于20％-25％且装载量是25％-100％。

[0165] 可基于在冻干期间暴露于搁板和真空的表面积来选择小瓶尺寸。干燥时间与饼高度成正比，因此可基于测定为合理的饼高度来选择小瓶尺寸。直径相对于体积较大的小瓶可提供与搁板的大量接触以在冻干循环期间达成有效热传递。在大体积液体中的稀释抗体溶液将需要更多干燥时间。小瓶尺寸与制剂体积需要达到平衡，因为较大小瓶储存和运送起来更为昂贵且具有较大顶空与制剂比率，且在长期储存期间可使高比例的制剂暴露于水分的降解效应。对于300mg剂量，在冻干之前，抗α4β7抗体制剂的体积可为3ml、5ml、6ml、10ml、20ml、50ml或100ml。在一个方面，对于300mg剂量的60mg/ml溶液，小瓶尺寸是20ml。

[0166] 在冻干之后，小瓶可在真空下密封，例如塞住。或者，可在密封之前使气体(例如干燥空气或氮气)进入小瓶。在涉及氧化的情况下，允许进入冻干腔室的气体可包含延迟或防止冻干产物氧化的气体。在一个方面，气体是非含氧气体，例如氮气或惰性气体，例如氦气、氖气、氩气、氪气或氙气。在另一方面，气体是氮气或氩气。

[0167] 在一些实施方案中，冻干前抗α4β7抗体制剂体积与施用前复原溶液体积相同。例如，冻干前是约5.5ml的制剂可通过添加考虑到干燥固体体积的一定量的液体(例如水或生理盐水)复原成约5.5ml体积。在其它实施方案中，可能合乎需要的是将体积不同于复原溶液体积的抗α4β7抗体制剂冻干。例如，可将呈例如0.25×、0.5×或0.75×稀溶液形式的抗α4β7抗体制剂冻干且通过添加较少液体，例如比冻干前体积小75％、一半或25％来复原成1×。在一个实施方案中，可将呈30mg/ml抗体于5％蔗糖中的溶液形式的300mg剂量冻干且复原成60mg/ml抗体于10％蔗糖中的溶液。或者，冻干抗α4β7抗体制剂可复原成比冻干前制剂更稀的溶液。

[0168] 用抗体制剂的治疗

[0169] 在一个方面，本发明提供一种治疗受试者的疾病或病症的方法，所述方法包括以有效治疗例如人的疾病或病症的量向受试者施用本文所述的抗α4β7抗体制剂。人受试者可为成人(例如18岁或18岁以上)、青少年或儿童。人受试者可为65岁或65岁以上人士。与替代性治疗给药方案不同，65岁或65岁以上的人受试者不需要对本文所述的给药方案进行任何修改，且可施用本文所述的常规抗α4β7抗体制剂。

[0170] 受试者可已对用免疫调节剂、TNF-α拮抗剂或其组合进行的治疗缺乏足够反应、丧失反应或不耐受。患者可能先前已接受用至少一种用于炎症性肠病的皮质类固醇(例如泼尼松(prednisone))治疗。对皮质类固醇的反应不足是指尽管经历至少一个包括等于每日30mg泼尼松的剂量口服2周或静脉内1周的4周诱导方案，仍有持续活动性疾病的征象和症状。对皮质类固醇的反应丧失是指逐渐减少皮质类固醇至低于等于每日口服10mg泼尼松的

剂量的两次尝试失败。皮质类固醇的不耐性包括库欣氏(Cushing's)综合征、骨质减少/骨质疏松症、高血糖症、失眠症和/或感染的病史。

[0171] 免疫调节剂可为例如口服硫唑嘌呤(azathioprine)、6-巯基嘌呤或甲氨蝶呤(methotrexate)。对免疫调节剂的反应不足是指尽管经历至少一个8周方案或口服硫唑嘌呤(≥1.5mg/kg)、6-巯基嘌呤(≥0.75mg/kg)或甲氨蝶呤(≥12.5毫克/周),仍有持续活动性疾病的征象和症状。免疫调节剂的不耐性包括但不限于恶心/呕吐、腹痛、胰腺炎、LFT异常、淋巴球减少症、TPMT遗传突变和/或感染。

[0172] 在一个方面,受试者可已对TNF-α拮抗剂治疗缺乏足够反应、丧失反应或不耐受。TNF-α拮抗剂是例如抑制TNF-α的生物活性且优选结合TNF-α的药剂,如单克隆抗体,例如REMICADE(英利昔单抗(infliximab))、HUMIRA(阿达木单抗(adalimumab))、CIMZIA(赛妥珠单抗(certolizumab pegol))、SIMPONI(戈利木单抗(golimumab));或循环受体融合蛋白,如ENBREL(依那西普(etanercept))。对TNF-α拮抗剂的反应不足是指尽管经历5mg/kg IV(2个剂量相隔至少2周)英利昔单抗;一个80mg皮下剂量的阿达木单抗、随后一个40mg剂量(相隔至少两周);或400mg皮下赛妥珠单抗(2个剂量相隔至少2周)的至少一个4周诱导方案,仍有持续活动性疾病的征象和症状。对TNF-α拮抗剂的反应丧失是指在先前临床益处之后的维持给药期间症状复发。TNF-α拮抗剂的不耐性包括但不限于输注相关反应、脱髓鞘、充血性心脏衰竭和/或感染。

[0173] 如本文所用,溃疡性结肠炎受试者的缓解维持丧失是指Mayo计分增加至少3分且修正Baron计分(Modified Baron Score)增加至少2。

[0174] 在另一方面,本发明提供抗α4β7抗体制剂,所述制剂(1)可体外和/或体内结合α4β7整合素;以及(2)可调节α4β7整合素的活性或功能,如(a)结合功能(例如α4β7整合素结合于MAdCAM(例如MAdCAM—1)、纤维结合蛋白和/或VCAM—1的能力)和/或(b)白细胞浸润功能,包括白细胞在组织中的募集和/或积聚(例如抑制淋巴细胞迁移至肠粘膜组织的能力)。在一个实施方案中,制剂中的抗体可结合α4β7整合素,且可抑制α4β7整合素结合于其一个或多个配体(例如MAdCAM(例如MAdCAM—1)、VCAM-1、纤维结合蛋白),从而抑制白细胞浸润组织(包括白细胞在组织中的募集和/或积聚)。在另一实施方案中,制剂中的抗体可结合α4β7整合素,且可选择性抑制α4β7整合素结合于其一个或多个配体(例如MAdCAM(例如MAdCAM—1)、VCAM—1、纤维结合蛋白),从而抑制白细胞浸润组织(包括白细胞在组织中的募集和/或积聚)。所述抗α4β7抗体制剂可体外和/或体内抑制携带α4β7整合素的细胞细胞性粘着至粘膜组织(包括肠管相关组织、淋巴器官或白细胞(尤其是淋巴细胞,如T细胞或B细胞))中的血管内皮细胞。在另一实施方案中,本发明的抗α4β7抗体制剂可抑制α4β7与MAdCAM(例如MAdCAM—1)和/或纤维结合蛋白相互作用。在另一实施方案中,本发明的抗α4β7抗体制剂可选择性抑制α4β7与MAdCAM(例如MAdCAM—1)和/或纤维结合蛋白相互作用,例如而不抑制α4β7与VCAM相互作用。

[0175] 本发明的抗α4β7抗体制剂可用于调节(例如抑制(降低或阻止))α4β7整合素的结合功能和/或白细胞(例如淋巴细胞、单核细胞)浸润功能。例如,抑制α4β7整合素结合于配体(即一个或多个配体)的人源化免疫球蛋白可根据治疗与白细胞(例如淋巴细胞、单核细胞)浸润组织(特别是表达分子MAdCAM(例如MAdCAM—1)的组织)(包括白细胞在组织中的募集和/或积聚)相关的疾病的方法加以施用。

[0176] 向个体(例如哺乳动物,如人或其它灵长类动物)施用有效量的本发明的抗α4β7抗体制剂(即一种或多种制剂)来治疗所述疾病。例如,可根据本发明方法治疗发炎疾病,包括与白细胞浸润胃肠道(包括肠管相关内皮)、其它粘膜组织或表达分子MAdCAM(例如MAdCAM—1)的组织(例如肠管相关组织,如小肠和大肠的固有层的微静脉;以及乳腺(例如泌乳性乳腺))相关的疾病。类似地,可根据本发明治疗患有与由于白细胞结合于表达MAdCAM(例如MAdCAM—1)的细胞(例如内皮细胞)所致的白细胞浸润组织相关的疾病的个体。

[0177] 在一个实施方案中,可治疗的疾病因此包括炎症性肠病(IBD),如溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、回肠炎、乳糜泻(Celiac disease)、非热带口炎性腹泻(nontropical Sprue)、与血清阴性关节病相关的肠病、显微性或胶原性结肠炎、嗜酸性胃肠炎、或直肠结肠切除术和回肠肛门(ileoanal)吻合术后所致的囊炎(pouchitis)。炎症性肠病优选为克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。溃疡性结肠炎可为中度至重度活动性溃疡性结肠炎。治疗可使罹患中度至重度活动性溃疡性结肠炎的患者的粘膜愈合。治疗也可使患者的皮质类固醇使用减少、消除或减少以及消除。

[0178] 胰腺炎和胰岛素依赖型糖尿病是可使用本发明的制剂治疗的其它疾病。已报道MAdCAM(例如MAdCAM—1)是由来自NOD(非肥胖性糖尿病)小鼠以及BALB/c和SJL小鼠的外分泌胰脏中的一些血管表达。MAdCAM—1的表达据报道诱导于NOD小鼠的胰脏的发炎胰岛中的内皮上,且MAdCAM—1是在胰岛炎早期由NOD胰岛内皮表达的主要地址素(Hanninen,A.等,J.Clin.Invest.,92:2509-2515(1993))。用抗MAdCAM(例如抗MAdCAM—1)或抗β7抗体治疗NOD小鼠预防了糖尿病的发展(Yang等,Diabetes,46:1542-1547(1997))。此外,观察到表达α4β7的淋巴细胞在胰岛内积聚,且MAdCAM—1牵涉于淋巴瘤细胞通过α4β7与来自发炎胰岛的血管(Hanninen,A.等,J.Clin.Invest.,92:2509-2515(1993))或与套细胞淋巴瘤中的胃肠道(Geissmann等,Am.J.Pathol.,153:1701-1705(1998))的结合中。

[0179] 可使用本发明的制剂治疗的与粘膜组织相关的发炎疾病的实例包括胆囊炎、胆管炎(Adams和Eksteen,Nature Reviews6:244-251(2006);Grant等,Hepatology33:1065-1072(2001))(例如原发性硬化性胆管炎)、例如肠的白塞氏病(Behcet′s disease)或胆管周围炎(胆管和肝脏的周围组织)以及移植物抗宿主疾病(例如在胃肠道中(例如在骨髓移植之后)(Petrovic等,Blood103:1542-1547(2004))。如克罗恩氏病中所见,发炎常延伸超出粘膜表面,因此慢性发炎疾病(如类肉瘤病、慢性胃炎(例如自身免疫性胃炎(Katakai等,Iht.Immunol.,14:167-175(2002))和其它特发性病状)可经受治疗。

[0180] 本发明也关于一种抑制白细胞浸润粘膜组织的方法。本发明也关于一种治疗癌症(例如α4β7阳性肿瘤,如淋巴瘤)的方法。可使用本发明的制剂治疗的与粘膜组织相关的发炎疾病的其它实例包括乳腺炎(乳腺)和大肠急躁症(irritable bowel syndrome)。

[0181] 其病因利用MAdCAM(例如MAdCAM—1)与α4β7的相互作用的疾病或病原体可用本文所述的制剂中的抗α4β7抗体来治疗。所述疾病的实例包括如由人免疫缺乏病毒引起的免疫缺乏病症(参见例如WO2008140602)。

[0182] 本发明的制剂是以抑制α4β7整合素结合于其配体的有效量施用。对于疗法,有效量将足以达成所需治疗(包括防治)作用(如足以降低或防止α4β7整合素介导的结合和/或信号传导,从而抑制白细胞粘着和浸润和/或相关细胞反应的量)。有效量的抗α4β7抗体(例

如足以维持α4β7整合素的饱和(例如中和)的有效效价)可诱导炎症性肠病的临床反应或缓解。本发明的制剂可以单位剂量或多个剂量施用。剂量可通过本领域中已知的方法确定且可视例如个体的年龄、敏感性、耐受性和总体健康而定。施用模式的实例包括局部途径,如经鼻或吸入或经皮施用;肠内途径,如通过饲管或栓剂;以及肠胃外途径,如静脉内、肌内、皮下、动脉内、腹膜内或玻璃体内施用。抗体的适合剂量可为每次治疗约0.1mg/kg体重至约10.0mg/kg体重,例如约2mg/kg至约7mg/kg、约3mg/kg至约6mg/kg或约3.5mg/kg至约5mg/kg。在特定实施方案中,施用的剂量是约0.3mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg或约10mg/kg。

[0183] 抗α4β7抗体的最终剂型(例如在(例如于生理盐水或5%右旋糖输注系统中)稀释复原的抗体之后)可为约0.5mg/ml至约5mg/ml供施用。最终剂型可在介于以下之间的浓度下:约1.0mg/ml至约1.4mg/ml、约1.0mg/ml至约1.3mg/ml、约1.0mg/ml至约1.2mg/ml、约1.0至约1.1mg/ml、约1.1mg/ml至约1.4mg/ml、约1.1mg/ml至约1.3mg/ml、约1.1mg/ml至约1.2mg/ml、约1.2mg/ml至约1.4mg/ml、约1.2mg/ml至约1.3mg/ml、或约1.3mg/ml至约1.4mg/ml。最终剂型可在以下浓度下:约0.6mg/ml、0.8mg/ml、1.0mg/ml、1.1mg/ml、约1.2mg/ml、约1.3mg/ml、约1.4mg/ml、约1.5mg/ml、约1.6mg/ml、约1.8mg/ml或约2.0mg/ml。在一个实施方案中,总剂量是180mg。在另一实施方案中,总剂量是300mg。300mg抗α4β7抗体剂量可稀释于250ml生理盐水或5%右旋糖溶液中供施用。

[0184] 在一些方面,给药方案具有两个时期,即诱导期和维持期。在诱导期中,以快速提供适于某些目的(如诱导对抗体或其抗原结合片段的免疫耐受性或诱导临床反应及改善炎症性肠病症状)的有效量的抗体或其抗原结合片段的方式施用抗体或其抗原结合片段。当首次用抗α4β7抗体治疗时;当从抗α4β7抗体疗法以来长期缺乏治疗之后(例如超过三个月、超过四个月、超过六个月、超过九个月、超过一年、超过十八个月或超过两年)又进行治疗时;或在抗α4β7抗体疗法的维持期期间,若炎症性肠病症状已重现(例如从疾病缓解复发);则可对患者施用诱导期治疗。在一些实施方案中,诱导期方案产生高于在维持方案期间维持的平均稳态谷底血清浓度的平均谷底血清浓度,例如在下一剂量之前即刻的浓度。

[0185] 在维持期中,用稳定含量的抗体或其抗原结合片段以使由诱导疗法达成的反应延续的方式施用抗体或其抗原结合片段。维持方案可防止炎症性肠病的症状重现或复发。维持方案可向患者提供便利,例如作为简单给药方案或无需频繁治疗就诊。在一些实施方案中,维持方案可包括通过选自由以下组成的组的策略,例如以本文所述的制剂形式施用抗α4β7抗体或其抗原结合片段:小剂量、不频繁施用、自施用及前述任一者的组合。

[0186] 在一个实施方案中,例如在疗法的诱导期期间,给药方案提供有效量的于本文所述的制剂中的抗α4β7抗体或抗原结合片段用于诱导人患者的炎症性肠病的缓解。在一些实施方案中,有效量的抗α4β7抗体足以在诱导期结束时达成抗α4β7抗体的平均谷底血清浓度约5μg/ml至约60μg/ml、约15μg/ml至约45μg/ml、约20μg/ml至约30μg/ml或约25μg/ml至约35μg/ml。诱导期的持续时间可为治疗约四周、约五周、约六周、约七周或约八周。在一些实施方案中,诱导方案可利用选自由以下组成的组的策略:例如于本文所述的制剂中的抗α4β7抗体或其抗原结合片段的大剂量、频繁施用以及大剂量与频繁施用的组合。诱导给药可为一次或复数次一个以上剂量,例如至少两个剂量。在诱导期期间,剂量可以每日一次、每隔一天一次、每周两次、每周一次、每十天一次、每两周一次或每三周一次施用。在一些实施方

案中，诱导剂量是在抗α4β7抗体疗法的前两周内施用。在一个实施方案中，诱导给药可为在治疗开始(第0天)时一次和在治疗开始之后约两周时一次。在另一实施方案中，诱导期持续时间是六周。在另一实施方案中，诱导期持续时间是六周且在前两周期间施用复数个诱导剂量。

[0187] 在一些实施方案中，例如当开始治疗患有重度炎症性肠病的患者(例如抗TNFα疗法失败的患者)时，诱导期需要具有比患有轻度或中度疾病的患者更长期间。在一些实施方案中，患有重度疾病的患者的诱导期可具有至少6周、至少8周、至少10周、至少12周或至少14周的持续时间。在一个实施方案中，患有重度疾病的患者的诱导给药方案可包括第0周(开始治疗)一剂量、第2周一剂量和第6周一剂量。在另一实施方案中，患有重度疾病的患者的诱导给药方案可包括第0周(开始治疗)一剂量、第2周一剂量、第6周一剂量和第10周一剂量。

[0188] 在一个实施方案中，例如在疗法的维持期期间，给药方案维持抗α4β7抗体的平均稳态谷底血清浓度(例如下一剂量之前的平台浓度)约5μg/mL至约25μg/mL、约7μg/mL至约20μg/mL、约5μg/mL至约10μg/mL、约10μg/mL至约20μg/mL、约15μg/mL至约25μg/mL、或约9μg/mL至约13μg/mL。在另一实施方案中，例如在疗法的维持期期间，给药方案维持抗α4β7抗体的平均稳态谷底血清浓度约20μg/mL至约30μg/mL、约20μg/mL至约55μg/mL、约30μg/mL至约45μg/mL、约45μg/mL至约55μg/mL、或约35μg/mL至约40μg/mL。

[0189] 剂量可每周一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每6周一次、每8周一次或每10周一次加以施用。较高或较频繁剂量(例如每周一次、每2周一次、每3周一次或每4周一次)可适用于诱导活动性疾病的缓解或适用于治疗新患者，例如适用于诱导对抗α4β7抗体的耐受性。例如每4周一次、每5周一次、每6周一次、每8周一次或每10周一次的较不频繁剂量可适用于预防性疗法例如以维持患有慢性疾病的患者的缓解。在一个方面，治疗方案是在第0天、约第2周、约第6周时以及此后每4或每8周时进行治疗。在一个实施方案中，维持方案包括每8周剂量。在根据每八周一个剂量的维持方案的患者经历一种或多种疾病症状重现(例如复发)的一个实施方案中，给药频率可例如增加至每4周一次。

[0190] 可在约20分钟、约25分钟、约30分钟、约35分钟或约40分钟内向患者施用剂量。

[0191] 可将给药方案优化以诱导患者的炎症性肠病的临床反应和临床缓解。在一些实施方案中，给药方案不改变接受治疗的患者的脑脊髓液中的CD4与CD8比率。

[0192] 在一些方面，可用优化给药方案达成开始治疗之后六个月或一年内的持久临床缓解，例如持续护理医师进行至少两次、至少三次、至少四次随访的临床缓解。

[0193] 在一些方面，可用优化给药方案达成持久临床反应，例如开始治疗之后持续至少6个月、至少9个月、至少一年的临床反应。

[0194] 在一个实施方案中，给药方案包含初始剂量300mg、在初始剂量之后约两周第二后续剂量300mg、在初始剂量之后约六周第三后续剂量300mg、随后在第三后续剂量之后每四周或每八周300mg第四剂量和后续剂量。

[0195] 在一些实施方案中，治疗方法、剂量或给药方案降低患者将对抗α4β7抗体产生HAHA反应的可能性。例如由对抗α4β7抗体有反应性的抗体所测量，HAHA的产生可增加抗α4β7抗体的清除率，例如降低抗α4β7抗体的血清浓度，例如降低结合于α4β7整合素的抗α4β7抗体的数目，由此使得治疗的有效性较小。在一些实施方案中，为了防止HAHA，可依次用诱导

方案和维持方案治疗患者。在一些实施方案中，在诱导方案与维持方案之间不存在中止。在一些实施方案中，诱导方案包括向患者施用复数个剂量的抗α4β7抗体。为了防止HAHA，当开始抗α4β7抗体疗法时，可用较高初始剂量(例如至少1.5mg/kg、至少2mg/kg、至少2.5mg/kg、至少3mg/kg、至少5mg/kg、至少8mg/kg、至少10mg/kg或约2mg/kg至约6mg/kg)或频繁初始施用(例如约每周一次、约每两周一次或约每三周一次)标准剂量来治疗患者。在一些实施方案中，治疗方法维持至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％患者呈HAHA阴性。在其它实施方案中，治疗方法维持患者呈HAHA阴性持续至少6周、至少10周、至少15周、至少6个月、至少1年、至少2年或持续疗法持续时间。在一些实施方案中，患者或至少30％、至少40％、至少50％或至少60％的产生HAHA的患者维持低效价(例如≤125)的抗α4β7抗体。在一个实施方案中，在开始抗α4β7抗体疗法之后，治疗方法维持至少70％患者呈HAHA阴性持续至少12周。

[0196] 制剂可单独或与另一药剂联合向个体(例如人)施用。本发明的制剂可在另一药剂施用之前、与另一药剂一起施用或在另一药剂施用之后施用。在一个实施方案中，施用一种以上抑制α4β7整合素结合于其配体的制剂。在所述实施方案中，可施用药剂，例如单克隆抗体，如抗MAdCAM(例如抗MAdCAM—1)或抗VCAM—1单克隆抗体。在另一实施方案中，另一药剂抑制白细胞结合于不同于α4β7路径的路径中的内皮配体。所述药剂可抑制例如表达趋化因子(C—C基元)受体9(CCR9)的淋巴细胞结合于胸腺表达的趋化因子(TECK或CCL25)或是防止LFA—1结合于细胞间粘着分子(ICAM)的药剂。例如，除本发明的制剂的之外，也施用抗TECK或抗CCR9抗体或小分子CCR9抑制剂(如公开于PCT公布WO03/099773或WO04/046092中的抑制剂)或抗ICAM—1抗体或阻止ICAM表达的寡核苷酸。在另一实施方案中，可与本发明的制剂联合施用另一活性成分，例如消炎化合物，如含有柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、5-氨基水杨酸的消炎剂；另一非类固醇消炎化合物；类固醇消炎化合物；或通常为控制IBD而施用的抗生素(例如环丙沙星(ciprofloxacin)、甲硝达唑(metronidazole))；或另一生物药剂(例如TNFα拮抗剂)。

[0197] 在一个实施方案中，共施用药物的剂量可在用包含抗α4β7抗体的制剂治疗期间随时间减少。例如，在用抗α4β7抗体制剂治疗开始时或之前用类固醇(例如泼尼松、泼尼龙)治疗的患者将经历早在用抗α4β7抗体制剂治疗6周时即开始的类固醇剂量减少方案。在用抗α4β7抗体制剂治疗期间，类固醇剂量将在开始逐渐减少的4-8周内减少约25％，在逐渐减少的约8-12周时减少50％且在逐渐减少的约12-16周时减少75％。在一个方面，通过用抗α4β7抗体制剂治疗约16-24周，可消除类固醇剂量。在另一实施例中，在用抗α4β7抗体制剂治疗开始时或之前用消炎化合物(如6-巯基嘌呤)治疗的患者将经历类似于如上所指示的类固醇给药逐渐减少方案的消炎化合物剂量减少方案。

[0198] 在一个实施方案中，所述方法包括向患者施用有效量的本发明的制剂。若制剂呈固体形式，例如干燥状态，则施用方法可包含使制剂转化为液态的步骤。在一个方面，干燥制剂可例如用如上所述的液体复原以用于注射，例如静脉内、肌内或皮下注射。在另一方面，固体或干燥制剂可例如以贴片、霜剂、气溶胶或栓剂形式局部施用。

[0199] 本发明也关于一种治疗与白细胞浸润表达分子MAdCAM(例如MAdCAM—1)的组织相关的疾病的方法。所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明的抗α4β7抗体制剂。在一个实施方案中，所述疾病是移植物抗宿主疾病。在一些实施方案中，所述疾病是与由于

表达α4β7整合素的白细胞结合于表达分子MAdCAM(例如MAdCAM—1)的肠管相关内皮所致的白细胞浸润组织相关的疾病。在其它实施方案中,所述疾病是胃炎(例如嗜酸性胃炎或自身免疫性胃炎)、胰腺炎或胰岛素依赖型糖尿病。在其它实施方案中,所述疾病是胆囊炎、胆管炎或胆管周围炎。

[0200] 本发明也关于一种治疗患者的炎症性肠病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向患者施用有效量的本发明的抗α4β7抗体制剂。在一些实施方案中,炎症性肠病是溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。在其它实施方案中,炎症性肠病是乳糜泻、与血清阴性关节病相关的肠病、显微性或胶原性结肠炎、胃肠炎(例如嗜酸性胃肠炎)或囊炎。

[0201] 在一些实施方案中,用抗α4β7抗体治疗不改变CD4:CD8淋巴细胞的比率。可测量血液、淋巴结吸出物及脑脊髓液(CSF)中的CD4:CD8比率。健康个体中的CSF CD4+:CD8+淋巴细胞比率通常大于或等于约1。(Svenningsson等,J.Neuroimmunol.1995;63:39-46;Svenningsson等,Ann Neurol.1993;34:155-161)。免疫调节剂可使CD4:CD8比率变得小于1。

[0202] 制品

[0203] 在另一方面,本发明是含有本发明的医药制剂且提供其使用说明书的制品。制品包含容器。适合容器包括例如瓶、小瓶(例如双室小瓶;液体制剂的小瓶,有针或无针;固体制剂的小瓶,有或无复原液体的小瓶,有针或无针)、注射器(如双室注射器、预装载注射器)和试管。容器可由多种材料(如玻璃、金属或塑料)形成。容器容纳制剂且于容器上或与容器相伴的标签可指示使用说明。在另一实施方案中,可制备制剂以供自施用和/或含有针对自施用的说明。在一个方面,容纳制剂的容器可为单次使用小瓶。在另一方面,容纳制剂的容器可为多次使用小瓶,其允许例如使用复原制剂的一个以上部分重复施用(例如2-6次施用)制剂。制品可进一步包括从商业和使用者立场出发所需的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有如先前章节所述的使用说明的药品说明书。

[0204] 临床和质量分析

[0205] 在另一方面,本发明是一种确定医药制剂满足产品质量标准的方法。所述方法可包括评估冻干医药制剂(例如人源化抗α4β7抗体),包括检查制剂以评估外观,测定复原时间,测定冻干制剂的水分含量,测量冻干制剂中的聚集体,测量片段化,测量氧化/脱酰胺以及任选评估生物活性和效力,其中达成预先确定的标准证明产品适于供临床使用。

[0206] 可接受的质量水平包括水分≤5.0%,复原时间≤40分钟,复原液体的pH6.3±0.3,抗体浓度54.0mg/ml至66.0mg/ml,主要同工型≥55.0%(根据CEX),单体≥96.0%(根据SEC),高分子量(聚集体)≤2.5%,H+L链≥90%(根据SDS-PAGE),参考标准粘着的60%-140%。

[0207] 通过参考以下实施例将更充分了解本发明。然而,其不应解释为限制本发明的范围。所有文献和专利引用都以引用的方式并入本文。

[0208] 制备制剂的开发方案

[0209] A.抗α4β7抗体溶液

[0210] 在室温下使装有冷冻高浓度抗α4β7抗体制剂(维多珠单抗、50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06%聚山梨醇酯80,pH6.3)的瓶解冻16-24小时。将解冻瓶汇合至不锈钢混配容器中且混合。接着用稀释缓冲液A(50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06%聚山梨醇酯80,pH6.3)稀

释制剂以获得80mg/mL维多珠单抗且混合。接着通过用含有蔗糖的稀释缓冲液B(50mM组氨酸、125mM精氨酸、40％蔗糖、0.06％聚山梨醇酯80，pH6.3)稀释制剂来添加蔗糖。这个步骤将抗α4β7抗体制剂稀释成含60mg/mL维多珠单抗、50mM组氨酸、125mM精氨酸、10％蔗糖、0.06％聚山梨醇酯80的液体制剂(pH6.3)。

[0211] B.冻干

[0212] 将于50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06％聚山梨醇酯80、10％蔗糖中的60mg/ml抗α4β7抗体液体制剂(pH6.3)以每个小瓶5.52mL填充至20mL玻璃小瓶中且将塞子置放在冻干位置。将小瓶装载于冻干机中设置在约20℃下的搁板上。在装载全部小瓶并关门之后，降低搁板温度以冷冻溶液(约-45℃)。在这个温度下3小时之后，升高搁板温度至-20℃以进行退火。在退火四小时之后，降低搁板温度以再冷冻溶液(约-45℃)。在使小瓶平衡至这个温度之后，从腔室抽空空气。当压力是150mTorr时，使搁板温度匀变至初级干燥温度约-24℃。继续进行初级干燥直至所有结晶冰都已从小瓶升华。接着升高搁板温度至27℃以进行16小时二级干燥，直至冻干制剂的水分约小于2.5％。当二级干燥完成时，使氮气回填至腔室中直至达到环境压力。塞住小瓶且从冻干机移除。

[0213] C.储存和使用冻干的抗α4β7抗体

[0214] 将含抗α4β7抗体的冻干小瓶储存在-70℃、-20℃、2℃-8℃或25℃下持续所需时期。当准备使用时，使小瓶平衡至室温。接着用使用21G针的含有注射用水(“WFI”)的注射器复原小瓶的内含物。确定WFI的量以使复原抗体溶液的最终体积与冻干前溶液的体积相同。对于5.52ml冻干前体积，添加4.8ml WFI。温和涡旋小瓶且接着保持10-30分钟以使制剂复原，随后使用注射器移除抗体溶液且添加至IV袋中以用于向患者进行IV输注。

[0215] 例证

[0216] 实施例1

[0217] 冻干制剂中不同糖％和氨基酸％的比较数据

[0218] 执行实验设计方法以考察不同糖(蔗糖和甘露糖醇)与蛋白质摩尔比、精氨酸与蛋白质摩尔比和组氨酸缓冲剂的摩尔量的影响。已知组氨酸和精氨酸在冻干过程期间不结晶，从而使其成为潜在低温或冻干保护剂。将1.5mL制剂填充至5mL小瓶中，所述小瓶用在-30℃、150mT下进行的初级干燥和在20℃、150mT下进行的二级干燥加以冻干。复原成1.5ml的冻干制剂在不同储存条件之后的稳定性显示于表1-3中(汇编来自两个实验的60mg/ml结果)。图6A显示当储存在40℃下时，当pH以及糖和精氨酸的摩尔比变化时，单体百分比、聚集体百分比和主要同工型百分比变化的预测模型。在低pH和(糖+精氨酸)与蛋白质的高摩尔比下，制剂的稳定性最佳。在检查的组氨酸摩尔量下，组氨酸不影响制剂的稳定性。所有制剂在储存期间都具有1％-2％水分。

[0219] 表1：当储存在5℃、25℃/60％RH和40℃/75％RH下3个月时的单体百分比变化。使用尺寸排阻色谱法(SEC)测量单体百分比。

[0220]

制剂 60 mg/mL 维多珠单抗 +	根据 SEC 的单体%			
	t=0	5℃ 3 个月	25℃ 60% RH 3 个月	40℃ 75% RH 3 个月
25 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、2%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.3	98.1	98.1	97.8	96.5
25 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、4%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.9	98.0	98.2	98.0	97.5
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、2%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.7	98.0	98.3	98.1	97.4
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、4%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.9	98.0	98.3	98.1	97.4

[0221]

50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、6%蔗糖、1.5%甘露糖醇、0.06%聚山梨醇酯 80，pH 6.3	98.7	98.4	98.4	98.1
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、9%蔗糖、0.06%聚山梨醇酯 80，pH 6.3	98.7	98.3	98.1	98.3

[0222] 表2：当储存在5℃、25℃/60％RH和40℃/75％RH下3个月时的聚集体百分比变化。使用尺寸排阻色谱法(SEC)测量单体百分比。

[0223]

制剂 60 mg/mL 维多珠单抗+	根据 SEC 的聚集体%			
	t=0	5℃ 3 个月	25℃ 60% RH 3 个月	40℃ 75% RH 3 个月
25 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、2%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.3	0.42	0.53	0.89	1.99
25 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、4%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.9	0.41	0.51	0.62	1.15
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、2%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.7	0.42	0.47	0.60	1.23
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、4%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.9	0.36	0.44	0.52	0.82
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、6%蔗糖、1.5%甘露糖醇、0.06%聚山梨醇酯 80，pH 6.3	0.53	0.49	0.51	0.56
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、9%蔗糖、0.06%聚山梨醇酯 80，pH 6.3	0.51	0.51	0.59	0.56

[0224] 表3：当储存在5℃、25℃/60％RH和40℃/75％RH下3个月时的主要同工型百分比变化。使用阳离子交换色谱(CEX)测量主要同工型。

[0225]

制剂 60 mg/mL 维多珠单抗+	根据 CEX 的主要同工型%			
	t=0	5℃ 3 个月	25℃ 60% RH 3 个月	40℃ 75% RH 3 个月
25 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、2%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.3	70.5	68.8	67.4	66.3
25 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、4%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.9	70.8	98.9	68.0	67.7
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、2%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.7	70.5	68.9	67.8	66.5
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、4%蔗糖、0.05%聚山梨醇酯 80，pH 6.9	70.6	68.9	68.0	67.4
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、6%蔗糖、1.5%甘露糖醇、0.06%聚山梨醇酯 80，pH 6.3	69.6	69.5	69.3	67.4
50 mM 组氨酸、125 mM 精氨酸、9%蔗糖、0.06%聚山梨醇酯 80，pH 6.3	69.5	69.3	69.2	68.1

[0226] 图6A显示基于对来自表1-3的40℃数据的统计分析的预测模型。根据SEC分析的在40℃下每个月单体百分比变化的模型是-3.10+(0.386)×pH+0.000516×((糖摩尔数+精氨酸摩尔数)/蛋白质摩尔数))。根据SEC分析的在40℃下每个月聚集体百分比变化的模型是2.43-(0.263)×pH-0.000787×((糖摩尔数+精氨酸摩尔数)/蛋白质摩尔数))。根据CEX分析的在40℃下每个月主要同工型百分比变化的模型是-2.54+(0.109)×pH-0.00130×((糖摩尔数+精氨酸摩尔数)/蛋白质摩尔数))。中心线显示预测模型的结果且外部线显示预测模型的95%置信区间。

[0227] 图6B显示当输入因子是pH、糖:蛋白质摩尔比和精氨酸:蛋白质摩尔比时，基于对来自表1-3的40℃数据的统计分析的替代性模型。根据SEC分析的在40℃下每个月单体百分比变化的模型是-3.02+(0.370)×pH+0.000482×((糖摩尔数)/(蛋白质摩尔数)+0.000657×((精氨酸摩尔数/蛋白质摩尔数)。根据SEC分析的在40℃下每个月聚集体百分比变化的模型是2.35-(0.244)×pH-0.000727×((糖摩尔数)/(蛋白质摩尔数)-0.00102×((精氨酸摩尔数)/(蛋白质摩尔数))。根据CEX分析的在40℃下每个月主要同工型百分比变化的模型是-2.92+(0.210)×pH+0.00164×((糖摩尔数)/)/(蛋白质摩尔数)-0.000220×((精氨酸摩尔数)/(蛋白质摩尔数))。中心线显示预测模型的结果且外部线显示预测模型的95%置信区间。

[0228] 实施例2

[0229] 稳定性数据

[0230] 测试三个初级稳定性批次的制剂(批次A、B和C)在规定储存条件下(5℃和25℃/60％RH,多达24个月)储存之后的稳定性。所有三个批次都含有相同冻干液体制剂:60mg/mL抗α4β7抗体、50mM组氨酸、125mM精氨酸、10％蔗糖、0.06％聚山梨醇酯80,pH6.3。对于批次A,将3.5mL溶液填充至20mL小瓶中且冻干,对于批次B和C,将5.52mL溶液填充至20mL小瓶中且冻干。

[0231] 在单独研究中,冻干分别为3.5ml和9.5ml的两个体积的含60mg/ml抗α4β7抗体、50mM组氨酸、125mM精氨酸、10％蔗糖、0.06％聚山梨醇酯80(pH6.3)的单一药物制剂以产生用于稳定性样本的批次R和S,历经38个月对所述样本进行分析。空白是NT(未测试)。

[0232] 数据(表4-19)显示当在5℃下储存多达38个月和在25℃/60％RH下储存多达30个月时,抗体制剂保持稳定。直至38个月时间点,所有产品属性都保持在规格内。

[0233] 表4:当储存在5℃下时根据SEC的单体百分比变化。

[0234]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	99.8	99.8	99.8	98.9	98.8
1	99.8	99.1	99.2	98.8	99.2

[0235]

3	99.8	99.1	99.1	98.8	98.8
6	99.8	99.8	99.8	98.9	99.0
9	99.1	99.2	99.2	99.2	99.1
12	99.4	99.0	99.0	98.8	98.9
15	99.4	99.1	99.1		
18	99.5	99.4	99.4	98.9	98.9
24	99.4	99.2	99.2	99.0	99.0
30		99.2	99.2		
38				99.3	99.3

[0236] 表5:当储存在5℃下时根据SEC的聚集体百分比变化。

[0237]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1
3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
9	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
12	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
15	0.2	0.2	0.2		
18	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
24	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
30		0.2	0.2		
38				0.2	0.2

[0238] 表6:当储存在5℃下时根据CEX的主要同工型百分比变化。

[0239]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	68.6	69.9	69.5	71.7	71.6
1	67.5	68.9	68.8	71.2	72.0
3	68.7	68.8	68.7	70.4	70.3
6	67.7	68.2	68.2	71.9	71.9
9	70.0	68.3	67.8	69.2	69.7
12	67.8	68.3	68.1	70.8	70.9
15	66.9	67.5	67.5		
18	67.4	67.0	66.7	71.0	70.8
24	68.1	69.6	69.1	71.3	70.9
30		68.5	68.6		
38				73.6	73.1

[0240] 表7：当储存在5℃下时根据CEX的酸性同工型百分比变化。

[0241]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	22.8	20.8	21.4	20.3	20.6
1	21.9	21.7	22.3	21.6	20.3
3	21.7	22.2	22.8	22.0	22.0

[0242]

6	22.9	23.1	23.6	21.1	21.4
9	19.8	22.2	22.9	21.8	21.8
12	22.9	21.3	22.1	21.2	21.2
15	22.7	22.3	22.8		
18	22.8	22.3	22.6	21.1	21.5
24	21.7	22.1	22.9	20.6	20.7
30		22.8	23.2		
38				18.9	19.1

[0243] 表8：当储存在5℃下时根据CEX的碱性同工型百分比变化。

[0244]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	8.5	9.3	9.1	8.1	7.8
1	10.7	9.4	8.9	7.3	7.7
3	9.7	9.0	8.5	7.6	7.8
6	9.5	8.7	8.2	7.0	6.7
9	10.2	9.6	9.3	9.0	8.4
12	9.3	10.3	9.9	8.0	7.9
15	10.4	10.1	9.7		
18	9.8	10.7	10.7	7.9	7.7
24	10.2	8.3	8.1	8.1	8.3
30		8.7	8.2		
38				7.5	7.7

[0245] 表9：当储存在5℃下时根据还原SDS Page的(H+L)％变化。

[0246]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	98	98	98	96	96
1	98	94	98	98	98
3	98	98	98	98	98
6	98	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	97	98	98
15	97	98	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	98	98	99	99
30		97	97		
38				99	99

[0247] 表10：当储存在5℃下时的结合功效变化。

[0248]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	107	106	105	93	102
1	106	106	103	103	111
3	101	109	108	91	98
6	97	106	105	114	121

[0249]

9	100	93	88	102	102
12	103	101	87	119	116
15	105	90	94		
18	86	101	96	95	104
24	92	82	95	81	101
30		87	94		
38				89	91

[0250] 表11：当储存在5℃下时根据KF的水分％变化

[0251]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	0.5	0.6	0.6	0.8	1.0
1	0.5	0.4	0.6		
3	0.5	0.6	0.6		
6	0.6	0.7	0.5	0.8	1.3
12	0.6	0.6	0.7	0.9	0.9
24	0.5	0.7	0.7	0.9	0.9
30		0.7	0.7		

[0252] 表12：当储存在25℃/60％RH下时根据SEC的单体百分比变化

[0253]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	99.8	99.8	99.8	98.9	98.8
1	99.8	99.1	99.2	98.7	98.7
3	99.8	99.0	99.0	98.6	98.5
6	99.8	99.7	99.7	98.9	98.9
9	99.0	99.1	99.1	99.1	99.1
12	99.3	98.9	98.9	98.8	98.9
15	99.3	99.0	99.0		
18	99.4	99.3	99.3	98.7	98.9
24	99.2	99.1	99.1	98.9	98.9
30		99.0	99.0		

[0254] 表13:当储存在25℃/60%RH下时根据SEC的聚集体百分比变化

[0255]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3
6	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2
9	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2
12	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3
15	0.3	0.3	0.3		
18	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2

[0256]

24	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
30		0.4	0.3		

[0257] 表14:当储存在25℃/60%RH下时根据CEX的主要同工型百分比变化

[0258]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	68.6	69.9	69.5	71.7	71.6
1	67.2	68.4	68.6	71.2	71.0
3	68.1	68.6	68.2	70.3	70.3
6	65.9	67.8	67.8	71.5	71.1
9	69.3	67.5	66.3	68.6	69.0
12	66.7	67.5	67.4	70.1	70.2
15	66.2	66.6	66.8		
18	66.1	65.8	64.9	70.0	70.3
24	66.7	68.4	68.2	70.6	70.1
30		67.2	67.2		

[0259] 表15:当储存在25℃/60%RH下时根据CEX的酸性同工型百分比变化

[0260]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	22.8	20.8	21.4	20.3	20.6
1	21.9	21.8	22.2	21.4	21.6
3	21.7	22.2	22.8	21.8	22.0
6	22.6	22.9	23.5	21.1	21.4
9	19.9	22.1	23.1	21.8	21.8
12	23.0	21.4	22.0	21.3	21.3
15	22.5	22.1	22.7		
18	22.6	22.1	22.6	21.3	21.5
24	21.7	21.9	22.6	20.7	20.7
30		22.7	23.2		

[0261] 表16:当储存在25℃/60%RH下时根据CEX的碱性同工型百分比变化

[0262]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	8.5	9.3	9.1	8.1	7.8
1	10.8	9.8	9.2	7.4	7.3
3	10.3	9.3	9.0	7.8	7.7
6	11.5	9.3	8.7	7.4	7.5
9	10.8	10.4	10.6	9.7	9.3
12	10.3	11.1	10.7	8.7	8.5
15	11.3	11.2	10.6		

[0263]

18	11.2	12.1	12.5	8.7	8.2
24	11.6	9.7	9.1	8.7	9.2
30		10.2	9.6		

[0264] 表17:当储存在25℃/60%RH下时根据还原SDS Page的(H+L)%变化

[0265]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	98	98	98	96	96
1	98	98	98	98	98
3	97	98	98	98	98
6	97	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	96	98	98
15	97	97	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	97	98	99	99
30		97	98		

[0266] 表18:当储存在25℃/60%RH下时的结合功效变化

[0267]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	107	106	105	93	102
1	115	103	109		
3	92	113	100	96	94
6	109	89	97	101	114
9	97	89	85	97	102
12	83	91	123		
15	96	91	96		
18	106	123	87	92	102
24	103	82	90	98	94
30		84	114		

[0268] 表19:当储存在25℃/60%RH下时根据KF的水分%变化

[0269]

时间(月)	批次 A	批次 B	批次 C	批次 R	批次 S
0	0.5	0.6	0.6	0.8	1.0
1	0.5	0.6	0.5		
3	0.5	0.7	0.6		
6	0.5	0.7	0.7	1.3	1.2
12	0.6	0.8	0.6	0.9	1.0
24	0.7	0.8	0.6	1.1	1.0
30		0.8	0.7		

[0270] 阳离子交换色谱(CEX)

[0271] 弱阳离子交换管柱上的磷酸盐/氯化钠梯度用于高效液相色谱系统中以分离抗α4β7抗体制剂中的带电荷物质且测定抗体物质的电荷组成。酸性同工型在主要同工型之前洗脱且碱性同工型在主要同工型之后洗脱。

[0272] 所有维多珠单抗批次的使用CEX测定产生的稳定性数据都呈现于表3、6-8和14-16中。各表显示在这些储存条件下,不存在主要同工型%降至55.0%以下的趋势。

[0273] 尺寸排阻色谱法(SEC)

[0274] 使用分析型SEC管柱(Tosoh Bioscience,LLC,King of Prussia,PA)进行SEC。移动相是磷酸盐缓冲生理盐水溶液且在280nm下监测吸光度。

[0275] 使用SEC测定产生的稳定性数据呈现于表1、2、4、5、12和13中。各表显示所列储存条件都不导致单体%降至96.0%以下。类似地,在所有所列储存条件下,所有批次的聚集体%都保持≤2.5%。

[0276] SDS-PAGE测定

[0277] 使用Invitrogen(Carlsbad,CA)Tris-甘氨酸凝胶(在还原条件下是4%-20%且在非还原条件下是4%-12%)进行SDS-PAGE。将复原抗体制剂样本于液体制剂缓冲液中稀释,随后以具有10%2-巯基乙醇(还原样本缓冲液)或不具有2-巯基乙醇(非还原样本缓冲液)的Tris-甘氨酸SDS样本缓冲液(2X,Invitrogen)1:2稀释。短暂加热样本且装载,以分子量标记物(Invitrogen)为对照。根据制造商说明书用胶状考马斯蓝(Invitrogen)染色凝胶。通过密度测定法分析蛋白质带以鉴定还原凝胶的重链和轻链%以及非还原凝胶的IgG%。

[0278] 使用还原SDS-PAGE测定产生的稳定性数据呈现于表9和17中。在所有稳定性批次的所列所有储存条件下都未观察到重链+轻链(H+L)%有明显变化。带型类似于参考标准的带型且(H+L)%保持在≥90%水平。

[0279] 结合功效

[0280] 使悬浮于含1％BSA的PBS、0.01％叠氮化钠中的HuT78细胞(人T细胞淋巴瘤细胞，美国菌种保存中心，Manassas，VA)与初级测试抗体的连续稀释液接触。在冰上孵育之后，洗涤细胞且以荧光标记的二级抗体处理。在再洗涤之后，将细胞固定且悬浮于FACS试剂中以通过流式细胞术(Becton Dickinson Franklin Lakes，NJ)进行分析；也参见美国专利号7，147，851。

[0281] 相对于参考标准测量维多珠单抗的结合功效且报道为参考标准％和EC50。稳定性数据呈现于表10和18中。参考标准％的数据显示变化性但在所有储存条件下都保持在规格界限内。无维多珠单抗评估批次显示在所列储存条件下结合功效减弱的趋势。

[0282] 水分(通过卡尔费休测定)

[0283] 用甲醇滴定制剂以测定库仑(coulometric)卡尔费休水分。水分数据呈现于表11和19中。在所有所列储存条件下，所有维多珠单抗评估批次的水分都小于5％。

[0284] 毛细管等电聚焦(cIEF)

[0285] 使用iCE280全柱检测cIEF系统(Convergent Biosciences，Toronto，Ontario)进行cIEF。两性电解质的选择可如由制造商所推荐或可为可商购两性电解质的组合。适用组合是3-10与5—8PHARMALYTETM的混合物(GE Healthcare，Piscataway，NJ)。

[0286] 实施例3：按比例扩大冻干过程建模

[0287] 使用质量源于设计(Quality by design)，同时操纵冷冻干燥器中的装载量和制剂的固体含量。装载量从33％至100％变化。通过在装载物中包括是目标制剂0.5×、1.0×和1.5×的制剂来使制剂固体含量从9％至27％变化。这些制剂具有类似$T_{g'}$。随着固体％增高，初级干燥时间增加。此外，在较高固体含量下，产物温度归因于R_p较大而增加。装载量也对两个干燥阶段具有影响(图8)。

[0288] 实施例4：非临床安全性研究

[0289] 设计用以比较那他珠单抗和维多珠单抗对恒河猴EAE中CNS免疫监视的影响的研究。八个动物每周一次用安慰剂对照给药。七个动物每周一次用那他珠单抗在30mg/kg下给药。七个动物每周一次用维多珠单抗在30mg/kg下给药。观察EAE的临床症状；通过流式细胞术测量CSF中自细胞子组的频率和比率；使用MRI测量脑中总T2病变负荷；且使用组织病理学测量脑的病变负荷和脱髓鞘。

[0290] 相较于安慰剂对照，维多珠单抗不延迟EAE的临床症状发作。其不抑制EAE的发病，也不抑制临床计分的量值。相较于安慰剂对照，那他珠单抗显著($p<0.05$)延迟EAE的临床症状发作。其抑制EAE的发病和临床计分的量值。(图9)

[0291] 维多珠单抗不阻止白细胞、T淋巴细胞(辅助T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞)、B淋巴细胞、天然杀手细胞或单核细胞浸润CSF。相反，那他珠单抗抑制对CSF的浸润。

[0292] 如通过MRI获得的T2增加和MTR值降低所检测，维多珠单抗不抑制脑病变的积聚。在除一个动物以外的全部动物中，那他珠单抗阻止病变形成。通过组织学测量对脑浸润和脱髓鞘的显著($p<0.05$)抑制。

[0293] 在研究期间维多珠单抗使α4β7整合素饱和，如通过体内给药的维多珠单抗与离体添加的分析性抗α4β7单克隆抗体之间的竞争性结合测定所示。在用维多珠单抗给药的动物中，分析性抗α4β7mAb不结合记忆辅助T淋巴细胞。因此，维多珠单抗在CNS中缺乏效应是归

因于α4β7整合素的胃肠营养(gastrointestinal-tropic)生物学。

[0294] 总之,维多珠单抗(一种α4β7拮抗剂)不抑制EAE。相反,那他珠单抗(α4β1和α4β7拮抗剂)抑制EAE。α4β1整合素介导EAE中对CNS的浸润。因此,维多珠单抗使患者易患PML的风险低于那他珠单抗,因为不拮抗α4β1整合素且不损害恒河猴EAE中的CNS免疫监视。

[0295] 实施例5:用维多珠单抗的第I期临床研究

[0296] 四十九个健康受试者被随机分组且接受单次剂量的研究药物:39个受试者接受维多珠单抗(5mg/mL抗体、20mM柠檬酸盐/柠檬酸、125mM氯化钠、0.05%聚山梨醇酯80,pH6.0(长期储存在-70℃下以及在-20℃下储存多达3个月))且10个受试者接受安慰剂。在接受维多珠单抗的39个受试者中,8个受试者各自在0.2mg/kg、2.0mg/kg、6.0mg/kg和10.0mg/kg下接受剂量且7个受试者在0.5mg/kg下接受维多珠单抗。所有49个受试者都完成研究。

[0297] 在维多珠单抗群组之间就任何人口资料和基线特征而言都不存在显著差异。平均年龄在35.4岁至51.0岁范围内;个别受试者年龄在21至63岁范围内。

[0298] PK结果

[0299] 以0.2mg/kg至10.0mg/kg的30分钟静脉内输注形式施用维多珠单抗。Cmax和血清药物浓度-时间曲线下面积(AUC)值随剂量增加而增加。在群组之间,剂量校正Cmax近似相同,从而指示这个参数具有剂量比例性。从时间零点至无穷的剂量标准化血清药物浓度值下面积(AUC_{0-inf})随剂量增加而增加直至2.0mg/kg,从而指示在这个研究中施用的较低剂量范围内AUC_{0-inf}增加与剂量增加存在非线性关系。此后,AUC_{0-inf}与剂量成比例增加,从而指示AUC_{0-inf}在剂量范围2.0mg/kg至10.0mg/kg内具有线性。相较于0.2mg/kg剂量,在10.0mg/kg剂量下,AUC_{0-inf}增加比预期高约2.4倍。

[0300] 类似地,在剂量范围0.2至2.0mg/kg内,清除率、分布体积和终末半衰期的估计值具有剂量依赖性。当剂量增加时,清除率降低,分布体积增加,且因此,终末消除半衰期延长。然而,从2mg/kg至10.0mg/kg,这些参数不存在明显变化,这表明维多珠单抗在低浓度下的快速消除过程发生饱和。线性消除过程较慢可能是在较高剂量下维多珠单抗的清除分数较大的原因。

[0301] 在一些发展针对维多珠单抗的HAHA的受试者中,观察到相较于在相应剂量水平内的HAHA阴性受试者,维多珠单抗的清除较快。

[0302] 表20:在健康受试者中IV施用0.2mg/kg-10.0mg/kg维多珠单抗之后就剂量群组而言的维多珠单抗PK的概述(PK分析集)

[0303]

参数	VDZ剂量	N	平均值	SD	几何平均值	CV%	中值	最小值	最大值
C_{max} (μg/mL)	0.2 mg/kg	4	5.65	0.629	5.62	11.1	5.45	5.13	6.56
	0.5 mg/kg	4	10.6	2.09	10.4	19.7	10.6	8.07	13.1
	2.0 mg/kg	7	59.3	11.6	58.4	19.6	58.4	47.6	78.4
	6.0 mg/kg	6	151	19.1	150	12.6	157	120	168
	10.0 mg/kg	7	243	22.1	243	9.07	242	213	281
$AUC_{0\text{-tlast}}$ (天×μg/mL)	0.2 mg/kg	4	31.6	4.98	31.3	15.8	31.6	25.7	37.5
	0.5 mg/kg	4	127	48.0	119	37.9	129	70.9	178
	2.0 mg/kg	7	964	147	955	15.2	972	772	1170
	6.0 mg/kg	6	3090	749	3020	24.2	2830	2360	4100
	10.0 mg/kg	7	4870	624	4840	12.8	4750	4120	5870
$AUC_{0\text{-inf}}$ (天×μg/mL)	0.2 mg/kg	4	39.5	5.79	39.1	14.7	40.2	31.7	45.7
	0.5 mg/kg	4	134	48.9	127	36.5	134	79.2	188

[0304]

	2.0 mg/kg	7	979	146	969	14.9	993	784	1180
	6.0 mg/kg	6	3100	750	3030	24.2	2840	2390	4110
	10.0 mg/kg	7	4880	637	4850	13.0	4750	4130	5920
V_z(L)	0.2 mg/kg	4	4.02	0.151	4.02	3.76	4.03	3.83	4.18
	0.5 mg/kg	4	4.92	0.620	4.89	12.6	4.66	4.52	5.84
	2.0 mg/kg	7	3.34	0.665	3.28	19.9	3.23	2.29	4.27
	6.0 mg/kg	6	2.98	0.644	2.92	21.6	2.98	2.06	3.98
	10.0 mg/kg	7	2.89	1.02	2.73	35.2	2.98	1.49	4.58
CL (L/天)	0.2 mg/kg	4	0.413	0.042	0.412	10.1	0.395	0.388	0.476
	0.5 mg/kg	4	0.310	0.106	0.297	34.3	0.291	0.212	0.446
	2.0 mg/kg	7	0.165	0.018	0.164	10.7	0.162	0.145	0.194
	6.0 mg/kg	6	0.140	0.031	0.136	22.0	0.145	0.083	0.166
	10.0 mg/kg	7	0.140	0.024	0.139	16.9	0.135	0.103	0.171
$t_{1/2}$ (天)	0.2 mg/kg	4	6.79	0.736	6.76	10.8	6.95	5.79	7.47
	0.5 mg/kg	4	11.7	2.83	11.4	24.2	11.4	9.09	14.8
	2.0 mg/kg	7	14.1	2.67	13.9	18.9	14.3	10.6	17.5
	6.0 mg/kg	6	15.1	3.15	14.8	20.9	14.0	11.9	20.3
	10.0 mg/kg	7	14.8	7.38	13.7	49.8	12.5	8.26	30.7

[0305] 缩写：AUC_{0-inf}=外推至无穷的药物浓度-时间曲线下面积；$AUC_{0-tlast}$=从施用时间至浓度高于定量下限的末个测量时间点的药物浓度-时间曲线下面积；CL=总清除率；C_{mx}=最大药物浓度；$t_{1/2}$=终末半衰期；V_z=基于终末期的分布体积。

[0306] 在达到C_{mx}之后，维多珠单抗的血清浓度以大体上单指数方式下降直至浓度达到约1mg/L至10mg/L。此后，浓度似乎以非线性方式下降。

[0307] C_{max}和AUC值随剂量增加而增加。对于可用数据，在群组之间，剂量校正Cmax近似相同，从而指示这个参数具有剂量比例性。剂量标准化AUC_{0-inf}随剂量增加而增加直至2.0mg/kg，从而指示在这个研究中施用的较低剂量范围内AUC_{0-inf}增加与剂量增加存在非线性关系。此后，AUC_{0-inf}与剂量成比例增加，从而指示AUC0-inf在剂量范围2.0mg/kg至10.0mg/kg内具有线性。相较于0.2mg/kg剂量，在10.0mg/kg剂量下，AUC_{0-inf}增加比预期高约2.4倍。

[0308] PD结果

[0309] 在30分钟静脉内输注0.2mg/kg至10.0mg/kg维多珠单抗之后就群组而言的维多珠单抗针对Act—1和MAdCAM的PD参数分别概述于表21和表22中。

[0310] 表21:在健康受试者中IV施用0.2mg/kg-10.0mg/kg维多珠单抗之后就剂量群组而言的维多珠单抗药力学,即Act-1^{+}[CD4^{+}CD45RO^{高}]%抑制百分比的概述(PD分析集)

[0311]

参数	VDZ剂量	N	平均值	SD	几何平均值	CV%	中值	最小值	最大值
E_{max} (抑制%)	0.2 mg/kg	4	99.6	0.387	99.6	0.388	99.6	99.1	100
	0.5 mg/kg	4	99.5	0.599	99.5	0.602	99.5	98.9	100
	2.0 mg/kg	6	99.9	0.172	99.9	0.172	100	99.6	100
	6.0 mg/kg	6	100	0.000	100	0.000	100	100	100
	10.0 mg/kg	6	99.7	0.326	99.7	0.327	99.8	99.3	100
$AUEC_{0-inf}$ (抑制%×天数)	0.2 mg/kg	4	4030	1010	3920	25.2	4090	2760	5160
	0.5 mg/kg	4	6430	1450	6300	22.6	6530	4860	7810
	2.0 mg/kg	6	13200	623	13200	4.72	12900	12800	14500
	6.0 mg/kg	6	16700	3030	16500	18.1	16300	13300	20100
	10.0	6	19300	644	19300	3.33	19600	18200	19900

[0312]

	mg/kg								

[0313] $AUEC_{0-inf}$=从时间0点至末个非零浓度的时间的药物效应相对于时间曲线下面积;E_{max}=最大药物效应

[0314] 表22:在健康受试者中IV施用0.2mg/kg-10.0mg/kg维多珠单抗之后就剂量群组而言的维多珠单抗药力学,即MADCAM^{+}[CD4^{+}CD45RO^{高}]%抑制百分比的概述(PD分析集)

[0315]

参数	VDZ剂量	N	平均值	SD	几何平均值	CV%	中值	最小值	最大值
E_{max}（抑制%）	0.2 mg/kg	4	99.2	0.537	99.2	0.542	99.4	98.4	99.6
	0.5 mg/kg	4	99.6	0.323	99.6	0.324	99.5	99.3	100
	2.0 mg/kg	6	99.7	0.365	99.7	0.366	99.7	99.2	100
	6.0 mg/kg	6	99.8	0.279	99.8	0.280	100	99.4	100
	10.0 mg/kg	6	100	0.000	100	0.000	100	100	100
$AUEC_{0-inf}$（抑制%×天数）	0.2 mg/kg	4	4000	576	3970	14.4	4210	3160	4440
	0.5 mg/kg	4	6770	1400	6660	20.6	6840	5170	8230
	2.0 mg/kg	6	13000	796	13000	6.12	13000	11700	13900
	6.0 mg/kg	6	16200	3320	15900	20.5	15800	11800	20000
	10.0 mg/kg	6	17700	1330	17700	7.5	17700	16500	19000

[0316] $AUEC_{0-inf}$=从时间0点至末个非零浓度的时间的药物效应相对于时间曲线下面积；E_{max}=最大药物效应

[0317] 维多珠单抗在可在血清中测量出维多珠单抗的所有时间点都接近最大限度地抑制PD参数Act—1和MAdCAM—1—Fc。一旦维多珠单抗浓度降至测定的检测限以下，对Act—1和MAdCAM—1—Fc的抑制即返回至近似基线水平。

[0318] 在一些发展针对维多珠单抗的HAHA的受试者中，观察到相较于在相应剂量水平下的HAHA阴性受试者，α4β7受体较快丧失饱和。

[0319] 安全性结果

[0320] 在单次IV剂量直至10.0mg/kg下，维多珠单抗总体上安全且耐受良好。在研究期间未发生死亡、严重不利事件(SAE)或导致研究中止的AE。

[0321] 免疫原性/人抗人抗体(HAHA)形成

[0322] 安慰剂组中一个(10％)受试者和组合维多珠单抗剂量组中21个(54％)受试者在研究期间的某一点具有阳性HAHA。尽管在所有剂量群组中都观察到阳性HAHA样本，但仅在2个最低维多珠单抗剂量组中发现HAHA效价>125。先前已用维多珠单抗观察到对HAHA形成的剂量依赖性抑制。22个呈HAHA阳性的维多珠单抗治疗受试者中有十九个存在中和性HAHA。

[0323] 表23：人抗人抗体研究结果的概述：安全性群体

[0324]

	安慰剂 N=10	0.2 mg/kg VDZ N=8	0.5 mg/kg VDZ N=7	2.0 mg/kg VDZ N=8	6.0 mg/kg VDZ N=8	10.0 mg/kg VDZ N=8	组合 VDZ N=39
测试的受试者	10	8	7	8	8	8	39
任何HAHA阳性，n(%)	1 (10)	6 (75)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	21 (54)
最高HAHA效价<125，n(%)	1 (10)	4 (50)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	17 (44)
最高HAHA效价≥125，n(%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)

[0325]

任何中和性HAHA阳性，n(%)	0	5 (63)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	19 (49)
最高中和性HAHA效价<125，n(%)	0	3 (38)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	15 (38)
最高中和性HAHA效价≥125，n(%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)

[0326] 安慰剂组中一个受试者和维多珠单抗组中11个受试者呈持续HAHA阳性。

[0327] 表24：总体人抗人抗体状态(安全性群体)

[0328]

	安慰剂 N=10	0.2 mg/kg VDZ N=8	0.5 mg/kg VDZ N=7	2.0 mg/kg VDZ N=8	6.0 mg/kg VDZ N=8	10.0 mg/kg VDZ N=8	组合 VDZ N=39
HAHA阴性[a] n(%)	9 (90)	2 (25)	3 (43)	6 (75)	5 (63)	2 (25)	18 (46)
分离的HAHA[b] n(%)	0	2 (25)	1 (14)	1 (13)	1 (13)	5 (63)	10 (26)
持续HAHA[c] n(%)	1 (10)_	4 (50)	3 (43)	1 (13)	2 (25)	1 (13)	11 (28)

[0329] a HAHA阴性:无阳性HAHA结果的受试者

[0330] b分离的HAHA:仅有1个阳性HAHA样本的效价<25的受试者

[0331] c持续HAHA:有2个或更多个阳性HAHA样本或有1个阳性样本的效价>25的受试者

[0332] 结论

[0333] 这个第1期研究表征由CHO细胞产生的维多珠单抗的PK/PD和初始安全性曲线。这个研究的结果用于支持炎症性肠病第3期关键试验的剂量选择。

[0334] 维多珠单抗显示Cmax参数在测试的剂量范围内具有剂量比例性;然而,观察到从0.2mg/kg至2.0mg/kg,AUC0-inf、CL、Vz和t1/2呈剂量依赖性变化,从而表明维多珠单抗的非线性PK特性。在大于2.0mg/kg的剂量水平下,未观察到这些参数有进一步变化,这表明维多珠单抗在低浓度下的快速消除过程发生饱和。线性消除过程较慢可能是在较高剂量下维多珠单抗的清除分数较大的原因。

[0335] 维多珠单抗在可在血清中测量出维多珠单抗时的所有时间点都在或接近最大程度上抑制PD参数Act—1和MAdCAM—1—Fc。一旦维多珠单抗浓度降至测定的检测限以下,对Act—1和MAdCAM—1—Fc的抑制即返回至近似基线水平。

[0336] 在一些发展针对维多珠单抗的HAHA的受试者中,观察到相较于在相应剂量水平内的HAHA阴性受试者,维多珠单抗的清除较快且α4β7受体较快丧失饱和。

[0337] 维多珠单抗耐受良好。在研究期间未发生死亡、SAE或导致中止研究药物施用的AE,也未观察到任何剂量-毒性关系。未报告全身机会性感染(包括PML)或赘瘤。

[0338] 不同于非特异性α4拮抗剂,维多珠单抗不伴有淋巴细胞增多或循环嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或单核细胞平均数增加,也不存在任何淋巴细胞去除迹象。

[0339] 维多珠单抗引发HAHA形成,但仅在2个最低剂量组中观察到最高效价(>125),这是支持免疫原性呈剂量依赖性降低的先前观察结果的研究结果。这些数据显示施用较高剂量的维多珠单抗可将临床显著HAHA形成减至最小。

[0340] 总之,当以0.2mg/kg至10.0mg/kg的单次剂量向健康受试者施用时,维多珠单抗总体上安全且耐受良好。

[0341] 实施例6:测定维多珠单抗对CD4:CD8比率的影响

[0342] 以从10%蔗糖的冻干制剂复原且稀释至0.9%生理盐水的输注系统中的单次450mg剂量的维多珠单抗治疗18-45岁健康受试者。在单次450-mg剂量的维多珠单抗之前

(基线)和之后5周,通过腰椎穿刺收集脑脊髓液(CSF)。各受试者充当其自身对照。

[0343] 基于先前研究选择5周时间点,所述研究显示以那他珠单抗治疗的MS患者仅在一个剂量之后即显示对CSF CD4+:CD8+淋巴细胞比率具有影响且减少脑病变的数目(Stuve等,Arch Neurol.2006;63:1383-1387;Stuve等,Ann Neurol.2006;59:743-747;Miller等,NEngl JMed.2003;348(1):15—23);且也因为在5周时,450-mg剂量的维多珠单抗足以使目标饱和且提供超过与每4周300mg的第3期给药方案相关的估计稳态谷底含量的血清浓度。

[0344] 从各受试者获得约15mL CSF用于免疫表型分析。若CSF样本满足以下准则,则将其纳入分析:每样本≤10RBC/μL(以将外周血液污染减至最少);阴性CSF培养结果;在各流式细胞术样本中有足够T淋巴细胞数目;以及未检测到针对维多珠单抗的血清抗体。

[0345] 第5周中值(34.80μg/mL)和个别受试者血清维多珠单抗浓度(范围24.9-47.9μg/mL)高于第3期给药方案的计划稳态谷底浓度(约24μg/mL)。如通过MAdCAM—1—Fc所测量,在第5周时观察到高度(>90%)α4β7受体饱和,从而指示维多珠单抗在终点评估时使其目标饱和。

[0346] 在任何CSF样本中都未检测到维多珠单抗(检测限值=0.125μg/mL)。

[0347] 对CD4+和CD8+T淋巴细胞数目和比率的影响

[0348] 维多珠单抗不显著减小CD4+:CD8+比率(表25)。受试者中无一者的给药后CD4+:CD8+比率<1(p<0.0001(1侧t检验))。维多珠单抗不显著减小CSF中的CD4+或CD8+T淋巴细胞的数目。此外,CSF CD4+T淋巴细胞%和CD8+T淋巴细胞%无显著变化(表26)。此外,未观察到外周血液WBC、CD4+和CD8+记忆T淋巴细胞有显著变化(表27)。

[0349] 表25:治疗对CSF CD4+:CD8+比率的影响(可评估群体,n=13)

[0350]

	基线	第5周	CD4+:CD8+比率差异†
CD4+:CD8+比率平均(SE)范围	3.59 (0.273) 1.53-5.67	3.60 (0.265)* 1.42-5.15	0.01 (0.197)
比率的90% 2侧CI	3.00-4.19	3.132, 4.077	
差异的90% 2侧CI			-0.337, 0.363

[0351] CI=置信区间

[0352] *p<0.0001(H0:μ<1对H1:μ>=1的一侧一个样本t检验)。

[0353] †差异定义为第5周比率减去基线比率

[0354] 表26:治疗对CSF CD4+和CD8+淋巴细胞计数的影响(可评估群体,n=13)

[0355]

	基线	第5周
淋巴细胞%形式的CD4+,平均值(SD)	75.160 (7.3831)	74.215 (6.3732)
淋巴细胞%形式的CD8+,平均值(SD)	22.272 (5.4320)	22.007 (6.1624)

[0356] 表27:外周血液记忆T淋巴细胞(RO+)计数(可评估群体,n=13)

[0357]

	基线	第5周

[0358]

	平均值(SD)	平均值(SD)
CD4+CD45RO+	27.85 (4.98)	27.06 (5.02)
CD8+CD45RO+(%)	11.24 (3.40)	10.78 (2.98)

[0359] 概述

[0360] 在单次450mg剂量之后，维多珠单抗不影响健康志愿者的CSFCD4+和CD8+细胞计数或CD4+:CD8+比率。受试者中无一者的给药后CSF CD4+:CD8+比率减小至小于1。在CSF中未检测到维多珠单抗。此外，未观察到外周血液中总WBC或记忆T淋巴细胞CD4+和CD8+子组有变化。在终点评估时，在所有受试者中都出现血液中目标(α4β7)饱和。CSF CD4+和CD8+淋巴细胞含量和比率类似于文献中先前报道的含量和比率。

[0361] 这些结果与维多珠单抗对猴的生理性CNS免疫监视与病理性CNS发炎两者缺乏影响一致(参见实施例4)。

[0362] 实施例7:维多珠单抗用于治疗IBD的长期临床经历

[0363] 完成第2期公开标签安全性扩展研究以评估维多珠单抗的长期药物动力学(PK)、药效学(PD)、安全性和功效。患者年龄是18至75岁，且先前已参与溃疡性结肠炎患者的初期PK/PD/安全性研究或已在筛选的36个月内具有内窥镜检查和/或组织病理学和/或放射学证实的IBD症状持续至少2个月。

[0364] 所有患者都接受以下静脉内给药方案:在第1、15和43天施用2mg/kg或6mg/kg维多珠单抗(5mg/mL抗体、20mM柠檬酸盐/柠檬酸、125mM氯化钠、0.05％聚山梨醇酯80，pH6.0(长期储存于-70℃且储存于-20℃多达3个月))，随后每8周一个剂量，持续多达总共78周。患者是未治疗的溃疡性结肠炎或克罗恩氏病患者，或已参与初期临床试验的溃疡性结肠炎患者。

[0365] 使用功效/生活质量(QoL)、部分Mayo计分(PMS)、克罗恩氏病活动性指数(CDAI)和炎症性肠病问卷(IBDQ)来评估研究结果。

[0366] PK结果

[0367] 平均输注前维多珠单抗浓度与剂量成比例，且在整个研究期间保持稳定和可检测。

[0368] PD结果

[0369] 在所有剂量水平下在整个研究期间受体(ACT—1+[CD4+CD45RO HIGH]％和MADCAM+[CD4+CD45RO HIGH]％)几乎完全受抑制。

[0370] 部分Mayo计分

[0371] 未治疗的溃疡性结肠炎患者(5.4)的基线平均PMS比溃疡性结肠炎滚动(rollover)患者(2.3)高。截至第43天，滚动溃疡性结肠炎患者与未治疗的溃疡性结肠炎患者的平均PMS均显示显著降低。截至第155天，两组的平均计分类似。平均PMS继续降低直至第267天，且此后平稳。

[0372] 克罗恩氏病活动性指数

[0373] CD患者的平均CDAI从基线时的294.6降低至第43天时的237.7，且继续降低直至第155天(156.1)。

[0374] IBDQ

[0375] 溃疡性结肠炎滚动患者在基线时具有最高平均IBDQ计分。截至第43天，平均IBDQ

计分在所有三个疾病组中都增加。平均IBDQ计分在所有3个疾病组中都继续随时间增加，对于克罗恩氏病患者，在第155天时达到最大，且对于未治疗的溃疡性结肠炎患者和溃疡性结肠炎滚动患者，在第491天时达到最大。

[0376] C-反应性蛋白

[0377] 溃疡性结肠炎滚动患者与克罗恩氏病患者均显示平均CRP含量降低直至第155天且随后平稳。未治疗的溃疡性结肠炎患者在基线时的平均CRP含量低于溃疡性结肠炎滚动患者(2.28对7.09)。未治疗的溃疡性结肠炎患者的平均CRP含量在评估的所有时间点都保持相对恒定。

[0378] 其它安全性结果

[0379] 在研究期间未报道全身机会性感染(包括PML)。一个患者在单一时间点被测试为JC病毒血症阳性，但在所有其它时间点都为JCV阴性。72个患者中有3个(4%)具有阳性HAHA结果(其中两个是短暂性阳性)。研究显示无肝毒性、淋巴球增多症或淋巴球减少症或任何其它药物相关实验室变化的迹象。

[0380] 结论

[0381] 以2.0mg/kg或6.0mg/kg每8周一次施用维多珠单抗持续多达78周达成目标受体饱和，与疾病活动性的持久平均降低和IBDQ计分提高相关，通常是安全且充分耐受的，且显示免疫原性可接受。

[0382] 实施例8：患有中度至重度活动性克罗恩氏病的患者的反应和缓解的诱导

[0383] 完成随机化双盲安慰剂对照多中心研究以评估在300mg剂量下的维多珠单抗(从60mg/ml抗体于50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06％聚山梨醇酯80、10％蔗糖(pH6.3)中的冻干制剂复原)在TNFα拮抗剂失败患者中在第6周时(在2个剂量-第0周和第2周之后)和在第10周时(在3个剂量之后)的诱导效应。研究由416个患者组成，其中75％遭遇TNFα拮抗剂失败，且其中25％未经TNFα处理。使治疗组之间的人口资料和伴随IBD药物平衡。也使治疗组之间的基线疾病特征平衡，基线疾病活动性除外。

[0384] 对研究指定的主要终点是抗TNF-α拮抗剂失败群体的第6周缓解(％)。评估(依序测试程序)的关键次要终点是：总群体的第6周缓解(％)、抗TNF-α拮抗剂失败群体和总群体的第10周缓解(％)(使用Hochberg程序)、抗TNF-α拮抗剂失败群体和总群体的第6周和第10周持续缓解(％)(使用Hochberg程序)、以及抗TNF-α拮抗剂失败群体的第6周增强反应(％)。

[0385] 表28：基线CDAI：

[0386]

	安慰剂	维多珠单抗	p值
TNF ITT：平均(标准偏差)	306.1 (55.43)	316.1 (52.63)	0.0945
总ITT：平均(标准偏差)	301.3 (54.97)	313.9 (53.17)	0.0153

[0387] 表29：诱导研究结果：主要和关键次要终点

[0388]

终点	TNF ITT (N=315)				总ITT (N=416)			
	PLA N=157	VDZ V=158	差 异 (RR)	P值	PLA N=207	VDZ N=209	差异 (RR)	P值
主要第6周缓解	12.1 %	15.2 %	3.0 % (1.2)	0.4332				
第1次要第6周缓解					12.1 %	19.1 %	6.9 % (1.6)	0.0478
第2次要第 10 周缓解	12.1 %	26.6 %	14.4 % (2.2)	0.0012	13 %	28.7 %	15.5 % (2.2)	<0.0001
持续缓解(第6周与第10周两者)	8.3 %	12.0 %	3.7 % (1.4)	0.2755	8.2 %	15.3 %	7% (1.9)	0.0249
增强反应(CDAI100)	22.3 %	39.2 %	16.9% (1.8)	0.0011				

[0389] 表30:未经抗TNF-α拮抗剂处理的患者的结果(n=101,总体的24%)

[0390]

	安慰剂%	维多珠单抗%	差异%	95% CI
第6周缓解	12	31.4	19.1	(3.3, 35.0)

[0391]

第10周缓解	16	35.3	19.2	(2.4, 35.8)

[0392] 表31:研究结果:ITT总体的关键子组-先前Tx失败第6周和第10周时的临床缓解

[0393]

子组	变量	安慰剂	VDZ	差异	95% CI
任何先前抗TNF失败(ITT的75%)	N	156	155		
	第6周缓解(%)	12.8	14.8	2	(-5.7, 9.7)
	第10周缓解(%)	12.8	26.5	13.6	(4.9, 22.3)
先前免疫调节剂失败而非抗TNF失败(21% ITT)	N	45	44		
	第6周缓解(%)	11.1	31.8	20.7	(-0.5, 39.7)
	第10周缓解(%)	15.6	31.8	16.3	(-1.1, 33.6)
仅先前皮质类固醇失败(3% ITT)	N	5	9		
	第6周缓解(%)	0	33.3	33.3	(-23.9, 75.7)
	第10周缓解(%)	0	44.4	44.4	(-13.4, 85.3)

[0394] 研究显示TNF-α拮抗剂失败患者需要3个剂量来诱导缓解。TNF-α拮抗剂失败患者的缓解率在第6周与第10周之间增加,但仅针对维多珠单抗组(而非安慰剂)。未经TNF-α拮抗剂处理的患者的缓解率在第6周与第10周之间实质上不增加。在具有高度疾病严重性的

TNF-α拮抗剂失败群体中，43％从未对TNF-α拮抗剂起反应，且45％丧失反应。

[0395] 实施例9：患有中度至重度活动性溃疡性结肠炎的患者的反应和缓解的诱导和维持

[0396] 设计包括两个随机化双盲多中心研究的单一试验以评估患有中度至重度活动性溃疡性结肠炎的患者的反应和缓解的诱导和维持。人口资料和基线疾病特征在所有治疗组之间都相当。

[0397] 使用静脉内施用的诱导研究将安慰剂与维多珠单抗(在从60mg/ml抗体于50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06％聚山梨醇酯80、10％蔗糖(pH6.3)中的冻干制剂复原的300mg剂量下)进行比较，其中终点是在2个剂量的维多珠单抗后第6周时。

[0398] 使用与诱导研究相同的制剂和施用途径的维持研究将安慰剂与每四周给药的维多珠单抗以及安慰剂与每八周给药的维多珠单抗进行比较。各患者年龄18—80岁，诊断有中度至重度活动性溃疡性结肠炎；在先前5年时期内显示对至少一种常规疗法(例如皮质类固醇)反应不足够、丧失反应或不耐受；且可正在接受治疗剂量的常规IBD疗法。这个研究的终点是在第52周时分析诱导反应者群体。试验的两个时期均满足其主要终点，即诱导期临床反应和维持期临床缓解。

[0399] 在研究期间收集血液样本以测量维多珠单抗的浓度。在诱导期结束时维多珠单抗的平均血清浓度是20μg/mL至30μg/mL。30分钟静脉内输注300mg剂量施用之后的稳态下平均维多珠单抗谷底血清浓度对于每8周1次方案在9μg/mL至13μg/mL之间且对于每4周1次方案在35μg/mL至40μg/mL之间。在输注结束时，维多珠单抗中值血浆浓度对于每8周1次(8周)方案在98μg/mL与101μg/mL之间且对于每4周1次(4周)方案在约129μg/mL与137μg/mL之间。

[0400] 对诱导和维持研究的反应的概述提供于表32-35中。相较于安慰剂，在第6周时，显著更大比例的维多珠单抗治疗患者达成临床反应、缓解和粘膜愈合(表32)。诱导期意图治疗群体中有39％遭遇先前抗TNFα失败。在遭遇先前抗TNF失败的患者与无先前抗TNF暴露的患者中，维多珠单抗患者的临床反应和缓解率均高于安慰剂患者。在直至第6周的初步分析中，安慰剂组中不利事件(AE)、严重AE和导致研究中止的不利事件的比率高于维多珠单抗组。相较于安慰剂患者，显著更大比例的维多珠单抗患者在第52周时达成临床缓解、粘膜愈合和无皮质类固醇缓解，且达成持久反应和缓解(表33)。维持研究群体中有32％遭遇先前抗TNFα失败。在TNF失败患者与未经TNF处理患者中，维多珠单抗的临床缓解和持久临床反应率均大于安慰剂。在第0-52周中，在安全性群体(N=895)中，不利事件(AE)、严重AE和严重感染的比率在维多珠单抗组与安慰剂组之间类似。在维多珠单抗组中未观察到机会性感染或肠道感染的比率增加。

[0401] 表32：诱导研究结果-主要和关键次要终点

[0402]

功效终点	安慰剂	维多珠单抗	差异/RR	P值
临床反应(%)	25.5%	47.1%	21.7%/1.8	<0.0001
临床缓解(%)	5.4%	16.9%	11.5%/3.1	0.0010
粘膜愈合(%)	24.8%	40.9	16.1%/1.6	0.0013

[0403] 表33：维持研究结果-主要和关键次要终点

[0404]

功效终点	安慰剂 N=126	VDZ Q8 N=122	VDZ Q4 N=125	差异/RR Q8对安慰剂 Q4对安慰剂	P值
临床缓解(%)	15.9	41.8	44.8	26.1/2.7 29.1/2.8	<0.0001 <0.0001
持久反应(%)	23.8	56.6	52.0	32.8/2.4 28.5/2.2	<0.0001 <0.0001
粘膜愈合(%)	19.8	51.6	56.0	32.0/2.6 36.3/2.8	<0.0001 <0.0001
持久缓解(%)	8.7	20.5	24.0	11.8/2.4 15.3/2.8	0.0090 0.0011
无皮质类固醇缓解(%)	13.9 n=72	31.4 n=70	45.2 N=73	17.6/2.3 31.4/3.3	0.0133 <0.0001

[0405] 表34：诱导研究：ITT群体中遭遇先前抗TNF-α拮抗剂失败的患者和无抗TNF暴露的患者在第6周时的临床反应和缓解

[0406]

遭遇先前抗TNF-α拮抗剂失败的患者(39%)				
终点	安慰剂 N=63	维多珠单抗 N=82	差异	95% CI
临床反应(%)	20.6	39.0	18.4	3.9, 32.9
临床缓解(%)	3.2	9.8	6.6	-9.8, 22.8
无抗TNF-α拮抗剂暴露的患者(55%)				
	安慰剂 N=76	维多珠单抗 N=130	差异	95% CI
临床反应(%)	26.3	53.1	26.8	13.7, 39.9
临床缓解%)	6.6	23.1	16.5	2.4, 30.2

[0407] 表35：在第52周时的临床缓解和持久临床反应：ITT群体中遭遇先前抗TNF-α拮抗剂失败的患者或无抗TNF-α拮抗剂暴露的患者

[0408]

遭遇先前抗TNF-α拮抗剂失败的患者(32%)					
终点	安慰剂 N=38	VDZ 每8周1次 N=43	VDZ 每4周1次 N=40	差异 每8周1次对安慰剂 每4周1次对安慰剂	95% CI
临床缓解(%)	5.3	37.2	35.0	31.9 29.7	10.3, 51.4 7.4, 49.4
持久临床反应(%)	15.8	46.5	42.5	30.7 26.7	11.8, 49.6 7.5, 45.9
无抗TNF-α拮抗剂暴露的患者(60%)					
	安慰剂 N=79	VDZ 每8周1次 N=72	VDZ 每4周1次 N=73	差异 每8周1次对安慰剂 每4周1次对安慰剂	95% CI
临床缓解(%)	19.0	45.8	47.9	26.8 29.0	12.4, 41.2 14.6, 43.3
持久临床反应(%)	26.6	65.3	56.2	38.7 29.6	24.0, 53.4 14.6, 44.6

[0409] 实施例10:患有中度至重度活动性克罗恩氏病的患者的反应和缓解的诱导和维持

[0410] 设计包括两个随机化双盲多中心研究的单一试验以评估患有中度至重度活动性克罗恩氏病的患者的反应和缓解的诱导和维持。人口资料和基线疾病特征在所有治疗组之间都相当。

[0411] 使用静脉内施用的诱导研究将安慰剂与维多珠单抗(在从60mg/ml抗体于50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH6.3)中的冻干制剂复原的300mg剂量下)进行比较,其中终点是在2个剂量的维多珠单抗后第6周时。

[0412] 使用与诱导研究相同的制剂和施用途径的维持研究将安慰剂与每四周给药的维多珠单抗以及安慰剂与每八周给药的维多珠单抗进行比较。此研究的终点是在第52周时分析诱导反应者群体。

[0413] 惊人的是,此研究显示每4周1次组和每8周1次组产生极类似结果。对诱导和维持研究的反应的概述提供于表36-39中。相较于安慰剂,显著更大比例的维多珠单抗治疗患者达成临床缓解和反应增强(表36)。在遭遇先前抗TNF失败的患者与无先前抗TNF暴露的患者中,维多珠单抗患者的临床缓解和反应增强率均高于安慰剂患者。不利事件(AE)、严重AE和严重感染的比率在维多珠单抗组与安慰剂组之间类似。在维多珠单抗组中未观察到机会性感染或肠道感染的比率增加。

[0414] 表36:诱导研究结果-主要和次要终点

[0415]

终点	安慰剂 N=148	维多珠单抗 N=220	调整差异/RR	P值
临床缓解%)	6.8%	14.5%	7.8%/2.1	0.0206
增强反应(%)	25.7%	31.4%	5.7%/1.2	0.2322
平均CRP变化(μg/mL)	-3.6 N=147	-2.9 N=220		0.9288

[0416] 表37:维持研究结果-主要和关键次要终点

[0417]

功效终点	安慰剂 N=153	VDZ Q8 N=154	VDZ Q4 N=154	调整差异/RR Q8对安慰剂 Q4对安慰剂	P值
临床缓解(%)	21.6	39.0	36.4	17.4/1.8 14.7/1.7	0.0007 0.0042
增强反应(%)	30.1	43.5	45.5	13.4/1.4 15.3/1.5	0.0132 0.0053
无皮质类固醇缓解(%)	15.9 N=82	31.7 N=82	28.8 N=80	15.9/2.0 12.9/1.8	0.0154 0.0450
持久缓解(%)	14.4	21.4	16.2	7.2/1.5 2.0/1.1	0.1036 0.6413

[0418] 表38:ITT群体中遭遇先前抗TNF-α拮抗剂失败的患者和无抗TNF暴露的患者在第6周时的临床缓解和增强反应

[0419]

遭遇先前抗TNF-α拮抗剂失败的患者(48%)				
终点	安慰剂 N=70	维多珠单抗 N=105	差异	95% CI
临床缓解(%)	4.3	10.5	6.2	(-9.1, 21.3)
增强反应(%)	22.9	23.8	1.0	(-11.8, 13.7)

[0420]

无抗TNF-α拮抗剂暴露的患者(50%)				
	安慰剂 N=76	维多珠单抗 N=130109	差异	95% CI
临床缓解(%)	9.2	17.4	8.2	(-1.4, 17.9)
增强反应(%)	30.3	42.2	11.9	(-1.9, 25.8)

[0421] 表39:在第52周时的临床缓解和增强反应:ITT群体中遭遇先前抗TNF-α拮抗剂失败的患者或不具有抗TNF-α拮抗剂暴露的患者

[0422]

遭遇先前抗TNF-α拮抗剂失败的患者(51%)					
终点	安慰剂 N=78	VDZ 每8周1次 N=82	VDZ 每4周1次 N=77	差异 每8周1次对安慰剂 每4周1次对安慰剂	95% CI
临床缓解(%)	12.8	28.0	27.3	15.2 14.5	(3.0, 27.5) (2.0, 26.9)
增强反应(%)	20.5	29.3	37.7	8.8 17.1	(-4.6, 22.1) (3.1, 31.2)
无抗TNF-α拮抗剂暴露的患者(45%)					
	安慰剂 N=71	VDZ 每8周1次 N=66	VDZ 每4周1次 N=71	差异 每8周1次对安慰剂 每4周1次对安慰剂	95% CI
临床缓解(%)	26.8	51.1	46.5	24.8 19.7	(8.9, 40.6) (4.2, 35.2)
增强反应(%)	38.0	60.6	53.5	22.6 15.5	(6.3, 38.9) (-0.7, 31.7)

[0423] 表40.序列概述

[0424]

SEQ ID NO:	**所示序列**	**描述**
1	图1	编码人源化抗α4β7免疫球蛋白的重链的DNA
2	图1	人源化抗α4β7免疫球蛋白的重链的氨基酸序列
3	图2	编码人源化抗α4β7免疫球蛋白的轻链的DNA
4	图2	人源化抗α4β7免疫球蛋白的轻链的氨基酸序列
5	图3	LDP-02的成熟人源化轻链
6	图4	同属人κ轻链恒定区
7	图4	同属鼠κ轻链恒定区
8	参考第30页	重链小鼠ACT-1抗体的CDR1

[0425]

	SYWMH	
9	参考第30页 EIDPSESNTNYNQKFKG	重链小鼠ACT-1抗体的CDR2
10	参考第30页 GGYDGWDYAIDY	重链小鼠ACT-1抗体的CDR3
11	参考第30页 RSSQSLAKSYGNTYLS	轻链小鼠ACT-1抗体的CDR1
12	参考第30页 GISNRFS	轻链小鼠ACT-1抗体的CDR2
13	参考第30页 LQGTHQPYT	轻链小鼠ACT-1抗体的CDR3
14	图7	人GM607 CL抗体κ轻链可变区
15	图7	人21/28 CL抗体重链可变区

[0426] 虽然本发明已参考其优选实施方案进行特定显示和描述，但本领域技术人员应了解，可在不脱离由随附权利要求涵盖的本发明的范围下在其中在形式和细节方面做出各种改变。

序列表

<110> 米伦纽姆医药公司

<120> 抗α4β7抗体的制剂

<130> 079259-0615

<140>
<141>

<150> 61/585,859
<151> 2012-01-12

<150> 61/550,545
<151> 2011-10-24

<150> 61/481,533
<151> 2011-05-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1445
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> 人工序列说明：合成的聚核苷酸

<400> 1

[0001]

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa 60

cagctacagg tgtccactcc caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gttaagaagc 120

ctggggcttc agtgaaggtg tcctgcaagg gttctggcta caccttcacc agctactgga 180

tgcattgggt gaggcaggcg cctggccaac gtctagagtg gatcggagag attgatcctt 240

ctgagagtaa tactaactac aatcaaaaat tcaagggacg cgtcacattg actgtagaca 300

tttccgctag cacagcctac atggagctct ccagcctgag atctgaggac actgcggtct 360

actattgtgc aagaggggat tacgacggat gggactatgc tattgactac tggggtcaag 420

gcaccctggt caccgtcagc tcagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac 480

cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact 540

tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct 600

tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct 660

ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca 720

aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc 780

cagcacctga actcgcgggg gcaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca 840

cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag 900

accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa 960

agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc 1020

accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag 1080

ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca 1140

ccctgccccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca 1200

aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1260

actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc 1320

tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg 1380

aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataatcta 1440

gagca 1445

<210> 2
<211> 470
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> 人工序列说明：合成的多肽

<400> 2
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

[0002] Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

[0003] Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 3
<211> 751
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> 人工序列说明：合成的聚核苷酸

<400> 3

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa 60

cagctacagg tgtccactcc gatgtagtga tgactcaaag tccactctcc ctgcctgtca 120

cccctggaga accagcttct atctcttgca ggtctagtca gagtcttgca aagagttatg 180

ggaacaccta tttgtcttgg tacctgcaga agcctggcca gtctccacag ctcctcatct 240

atgggatttc caacagattt tctggggtgc cagacaggtt cagtggcagt ggttcaggga 300

cagatttcac actcaagatc tcgcgaglag aggctgagga cgtgggagtg tattactgct 360

tacaaggtac acatcagccg tacacgttcg gacaggggac caaggtggag atcaagcgta 420

cggtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 480

ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga 540

aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca 600

aggacagcac ctacagcctc agcagcaccc tgaccctgag caaagcagac tacgagaaac 660

acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct 720

tcaacagggg agagtgttag tctagagcag c 751

<210> 4
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> 人工序列说明：合成的多肽

<400> 4

[0004]

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                  10                  15

Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
            20                  25                  30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
        35                  40                  45

Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160
```

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 5
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> 人工序列说明：合成的多肽

<400> 5
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser
20 25 30

[0005]

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

[0006]

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 7
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 8
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 9
Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 10
Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

[0007]

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 11
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 12
Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 13
Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr
1 5

<210> 14
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

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

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

[0008]

<400> 15
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

新LDP02重链DNA--含有克隆位点(小写)、Kozak序列(大写)和前导序列(小写)

gaattctcgagatcgatCTCACCatgggatggagctgtatcatcctcttctggtagcaacagctacaggtgtccactcccag
gtgCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCCTGCAAGGGTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCATTGGG
TGAGGCAGGCGCCTGGCCAACGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
TGAGAGTAATACTAACTACAATCAAAAATTCAAGGGACGCGTCACATTGACT
GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC
TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC
ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCGGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGC

图1A

AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
GCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAtaatctagagca

新LDP02重链蛋白质(VHL、VH与人IgG1-FcRmut之间的间隔)

MGWSCIILFLVATATGVHS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIDP
SESNTNYNQKFKGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGWDY
AIDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

图1B

新LDP02重链DNA--含有克隆位点（图2）、Kozak序列(大写)和前导序列(小写)

gaattctcgagatcgatCTCACCatgggatggagctgtatc ttggtagcaacagctacaggtgtccactccgat
GTAGTGATGACTCAAAGTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTGGAGAACCAGC
TTCTATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAAGAGTTATGGGAACACCT
ATTTGTCTTGGTACCTGCAGAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT
GGGATTTCCAACAGATTTTCTGGGGTGCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGTT
CAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCTCGCGAGTAGAGGCTGAGGACGTGGG
AGTGTATTACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTCGGACAGGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT
CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGGACAGCAAGGACAGCAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagtctagagcagc

新LDP02轻链蛋白质(VKL、VK与人CK之间的间隙)

MGWSCIILFLVATATGVHS
DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYGI
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQPYTFGQGTKVEI
K
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图2

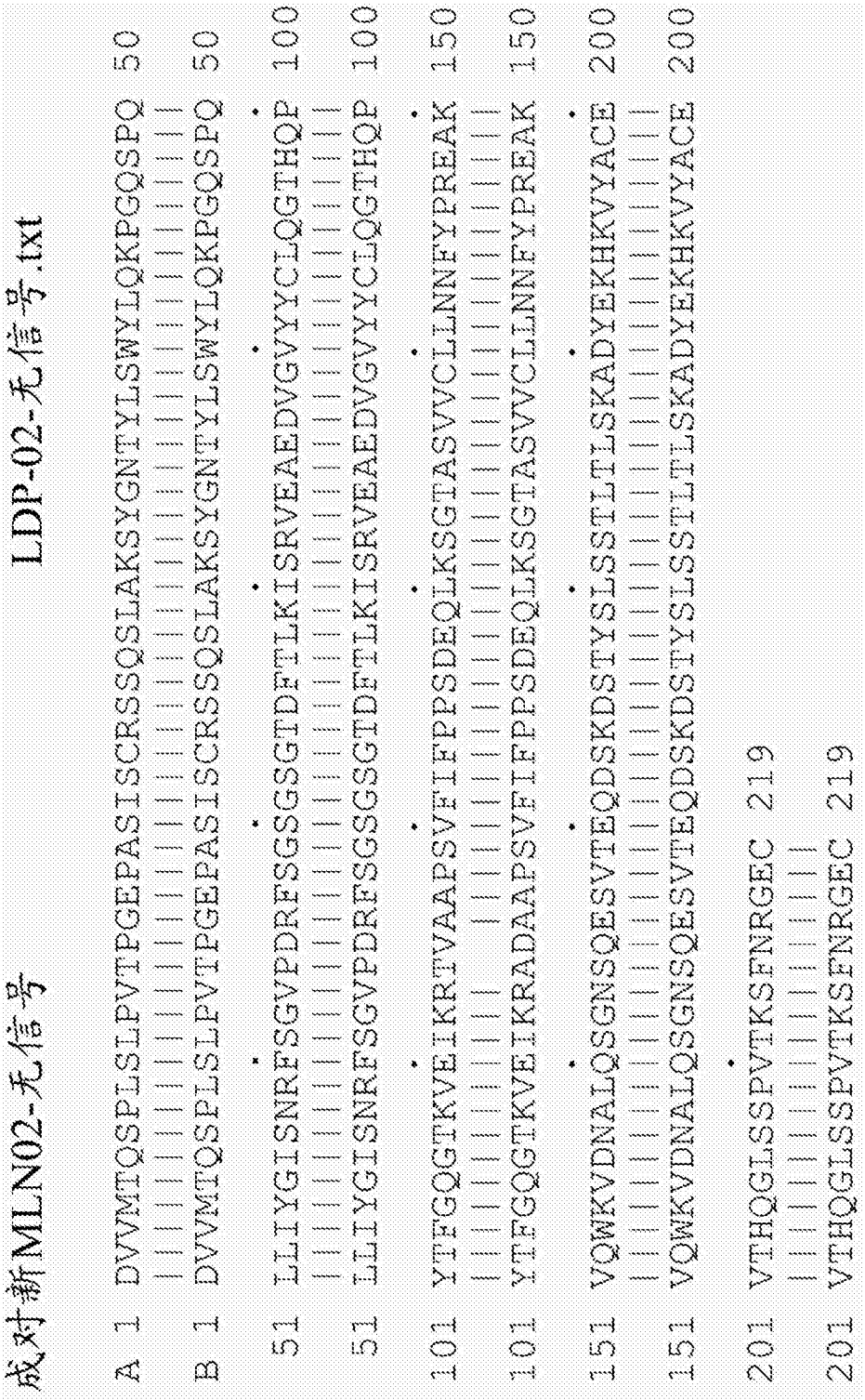

成对新MLN02-无信号 LDP-02-无信号.txt
A 1 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ 50
B 1 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ 50
51 LLIYGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQP 100
51 LLIYGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQP 100
101 YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK 150
101 YTFGQGTKVEIKRADAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK 150
151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE 200
151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE 200
201 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC 219
201 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC 219

图3

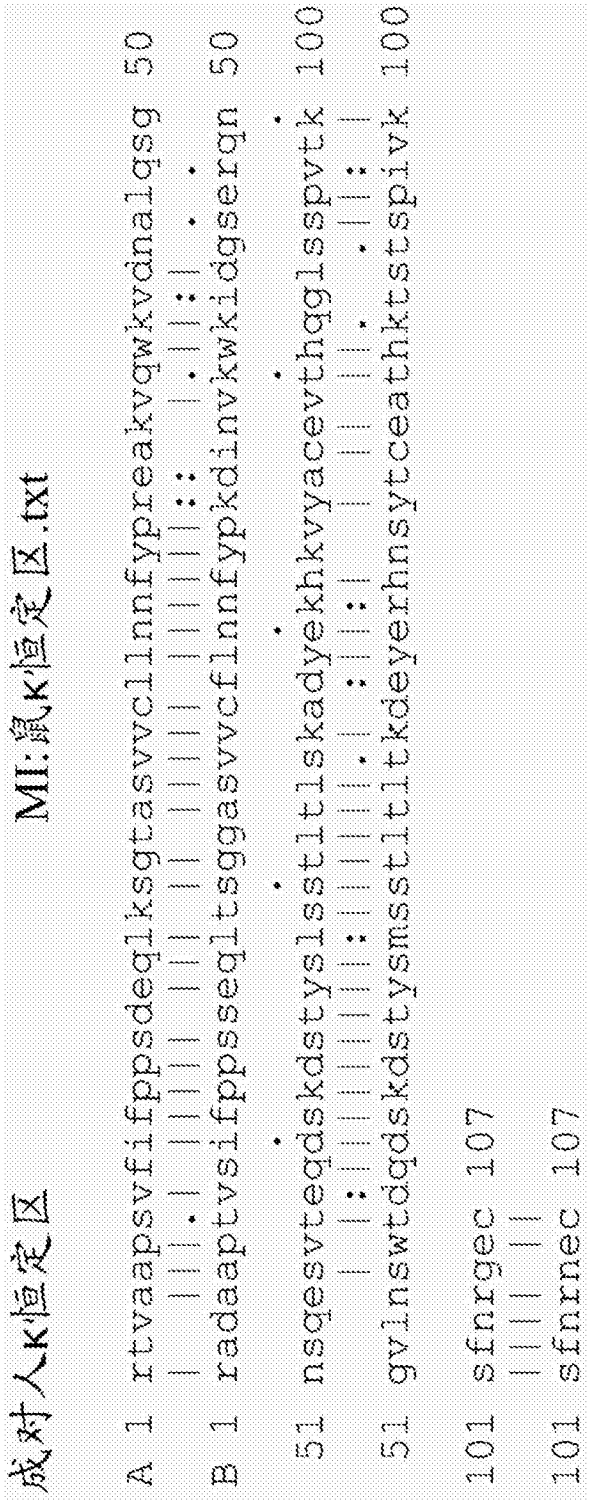
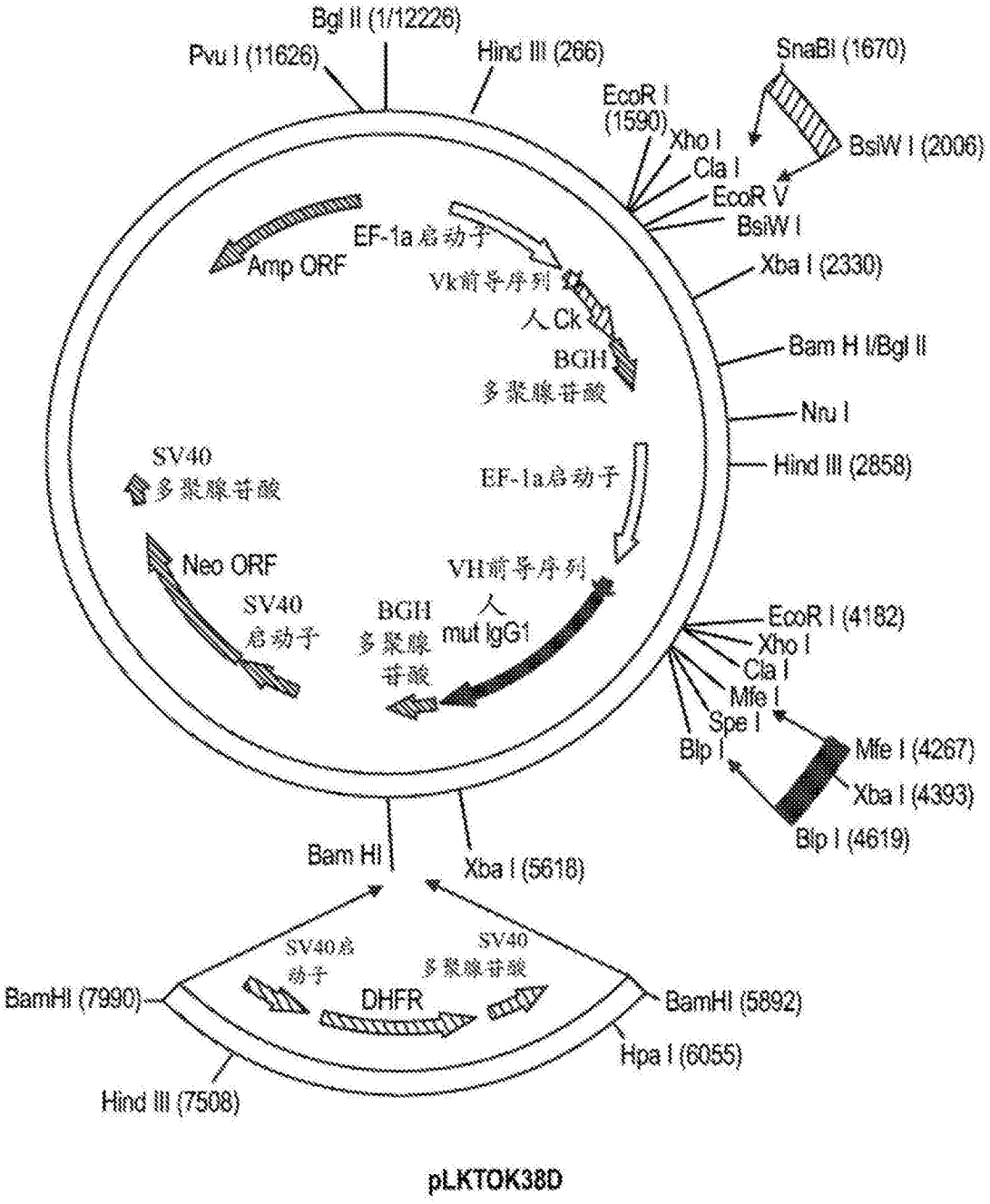

成对人K恒定区
MI:鼠K恒定区.txt
A 1 rtvaapsvfifppsdeqlksqtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsg 50
B 1 radaaptvsifppsseqltsqgasvvcflnnfypkdinvkwkidgserqn 50
51 nsqesvteqdskdstyslssttltlskadyekhkvyacevthqglsspvtk 100
51 qvlnswtqdskdstysmssttltlkdeyerhnsytceathktstspivk 100
101 sfnrgec 107
101 sfnrnec 107

图4



pLKTOK38D

图5

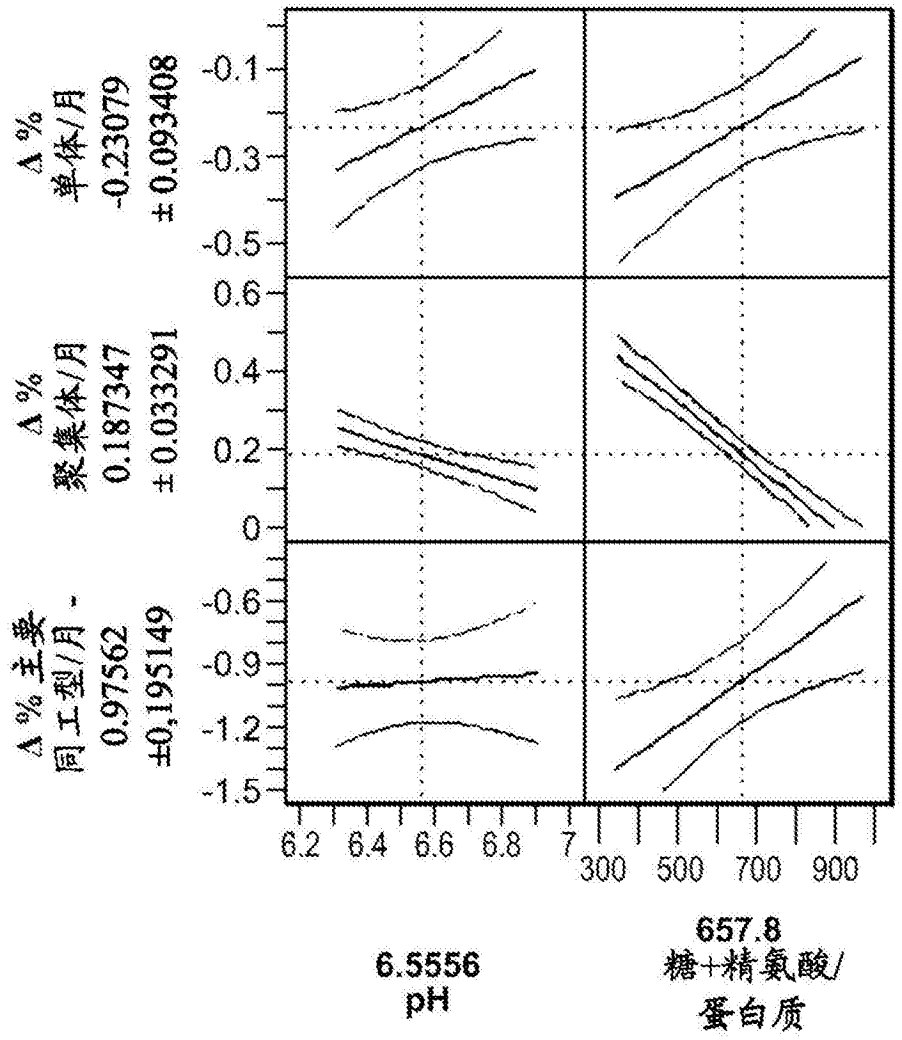

Δ %
单体/月
-0.23079
±0.093408
Δ %
聚集体/月
0.187347
±0.033291
Δ % 主要
同工型/月 -
0.97562
±0,195149
-0.1
-0.3
-0.5
0.6
0.4
0.2
0
-0.6
-0.9
-1.2
-1.5
6.2 6.4 6.6 6.8 7
300 500 700 900
6.5556
pH
657.8
糖+精氨酸/
蛋白质

图6A

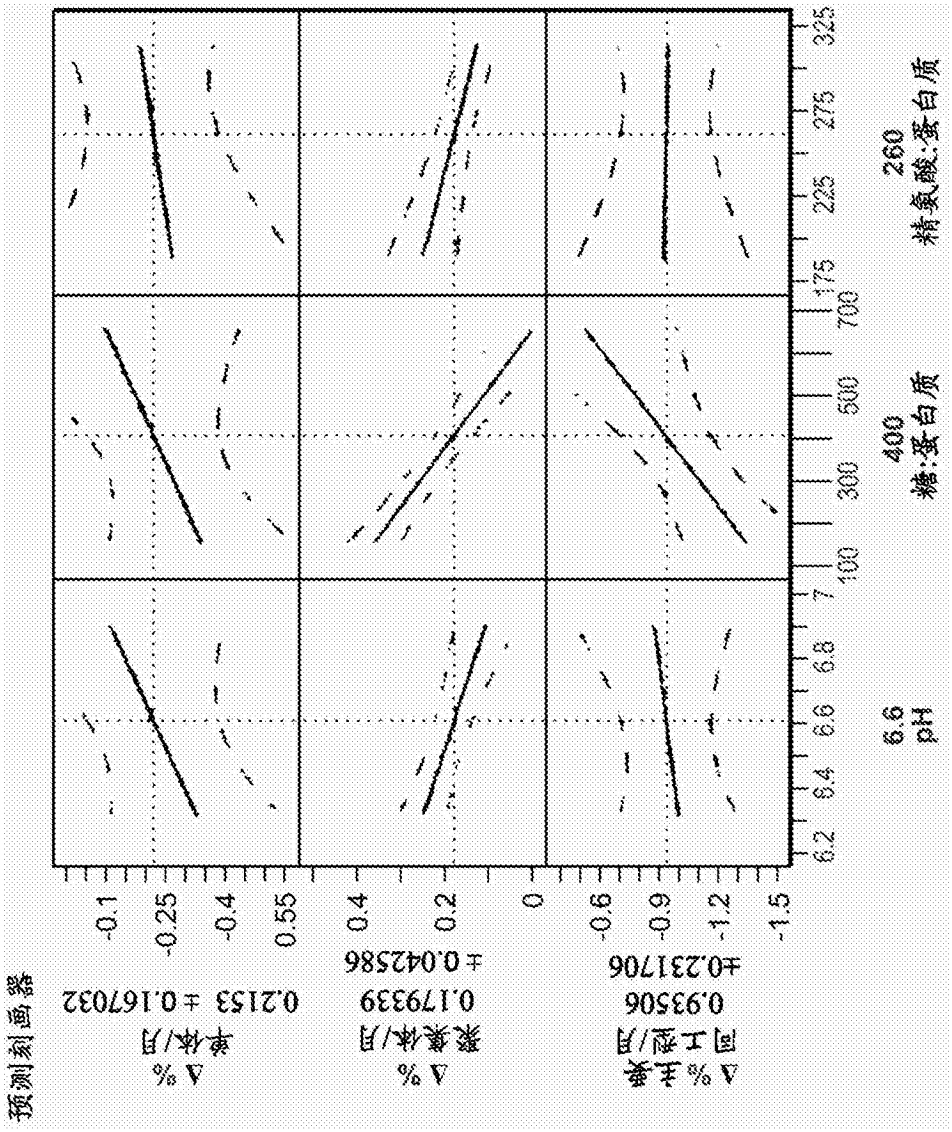

预测响应曲面
Δ %
单体/月
0.2153 ± 0.167032
Δ %
聚集体/月
0.179339
± 0.042586
Δ % 主要
同工型/月
0.93506
±0.231706
-0.1
-0.25
-0.4
0.55
0.4
0.2
0
-0.6
-0.9
-1.2
-1.5
6.2
6.4
6.6
6.8
7
pH
100
300
500
700
400
糖:蛋白质
175
225
275
325
260
精氨酸:蛋白质

图6B

GM607'C1抗体κ轻链可变区

SEQ ID NO: 14

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
                85                  90                  95

Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

21/28'CL抗体重链可变区

SEQ ID NO: 15

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

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

图7

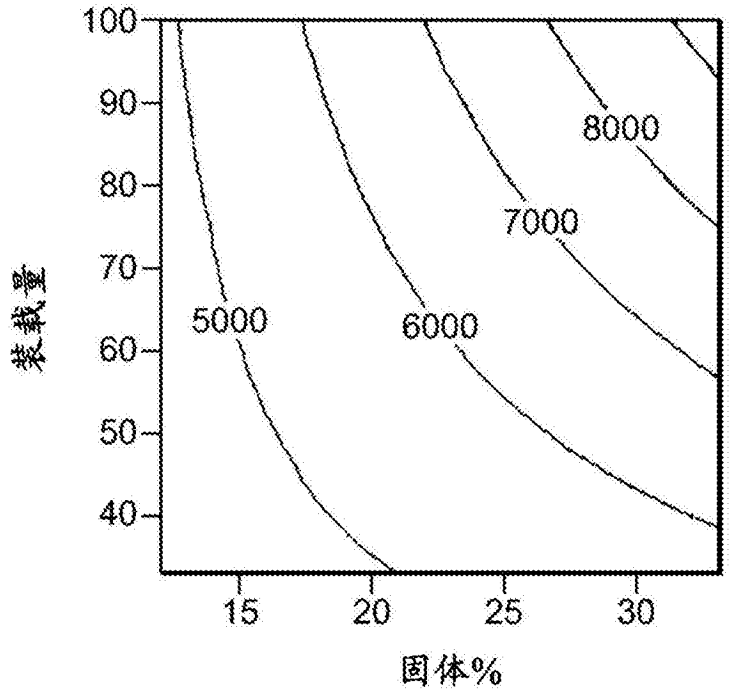

100
90
80
70
60
50
40
装载量
5000
6000
7000
8000
15
20
25
30
固体%

图8

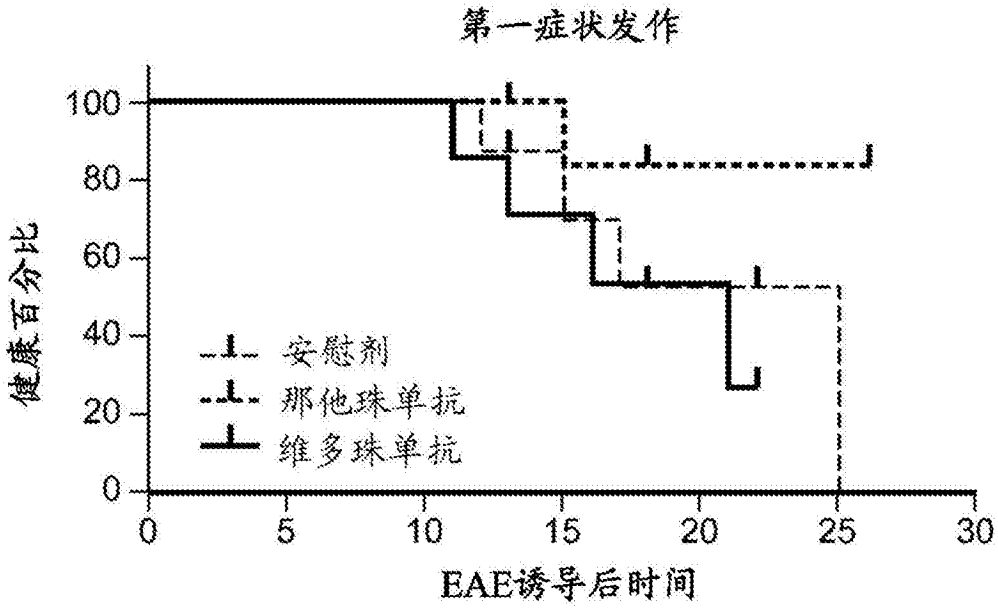

第一症状发作
100
80
60
40
20
0
健康百分比
安慰剂
那他珠单抗
维多珠单抗
0
5
10
15
20
25
30
EAE诱导后时间

图9