



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102958538 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 06

(21) 申请号 201180032002. 3

A61K 47/18(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 04. 26

(30) 优先权数据

61/330, 689 2010. 05. 03 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 12. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/034001 2011. 04. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02011/139718 EN 2011. 11. 10

(71) 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 M·N·鲍恩 J·刘 A·R·帕特尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 35 页

(54) 发明名称

用于降低含有蛋白质的制剂的粘度的组合物
和方法

(57) 摘要

本发明涉及某些化合物包括例如某些带电荷的氨基酸及其结构类似物用于降低含有蛋白质的水性制剂的粘度的用途。相关物质组合物及使用方法也包含在本发明之内。

1. 物质组合物,其包含蛋白质和能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物。
2. 权利要求 1 的物质组合物,其中所述蛋白质是抗体。
3. 权利要求 1 的物质组合物,其中所述能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物选自精氨酸-HCl、精氨酸琥珀酸盐、精氨酸二肽、精氨酸三肽、聚精氨酸、高精氨酸、2-氨基-3-胍基-丙酸、胍、鸟氨酸、胍丁胺、胍基丁酸、尿素、瓜氨酸、N-羟基-L-降-精氨酸、硝基精氨酸甲酯、精氨酸酰胺、精氨酸甲酯、精氨酸乙酯、赖氨酸、赖氨酸酰胺、赖氨酸甲酯、组氨酸、组氨酸甲酯、组胺、丙氨酸、丙氨酸酰胺、丙氨酸甲酯、腐胺、尸胺、亚精胺、精胺和甲硫氨酸。
4. 权利要求 3 的物质组合物,其中所述能够降低所述水性制剂的粘度的化合物以至少 10mM 的浓度存在。
5. 权利要求 3 的物质组合物,其中所述能够降低所述水性制剂的粘度的化合物以至少 20mM 的浓度存在。
6. 权利要求 3 的物质组合物,其中所述能够降低所述水性制剂的粘度的化合物以至少 50mM 的浓度存在。
7. 权利要求 3 的物质组合物,其中所述能够降低所述水性制剂的粘度的化合物以至少 100mM 的浓度存在。
8. 权利要求 3 的物质组合物,其中所述能够降低所述水性制剂的粘度的化合物以约 10mM 至约 1M 的浓度存在。
9. 权利要求 1 的物质组合物,其为水性形式。
10. 权利要求 1 的物质组合物,其为冻干形式。
11. 权利要求 1 的物质组合物,其中蛋白质浓度为至少 100mg/ml。
12. 权利要求 1 的物质组合物,其中所述粘度不超过 150cP。
13. 制品,其包含容纳有权利要求 1 的物质组合物的容器。
14. 降低含有蛋白质的制剂的粘度的方法,所述方法包括向所述制剂中添加降低粘度量的能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物的步骤。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物选自精氨酸-HCl、精氨酸琥珀酸盐、精氨酸二肽、精氨酸三肽、聚精氨酸、高精氨酸、2-氨基-3-胍基-丙酸、胍、鸟氨酸、胍丁胺、胍基丁酸、尿素、瓜氨酸、N-羟基-L-降-精氨酸、硝基精氨酸甲酯、精氨酸酰胺、精氨酸甲酯、精氨酸乙酯、赖氨酸、赖氨酸酰胺、赖氨酸甲酯、组氨酸、组氨酸甲酯、组胺、丙氨酸、丙氨酸酰胺、丙氨酸甲酯、腐胺、尸胺、亚精胺、精胺和甲硫氨酸。
16. 权利要求 14 的方法,其中添加所述化合物至至少 10mM 的终浓度。
17. 权利要求 14 的方法,其中添加所述化合物至至少 20mM 的终浓度。
18. 权利要求 14 的方法,其中添加所述化合物至至少 50mM 的终浓度。
19. 权利要求 14 的方法,其中添加所述化合物至至少 100mM 的终浓度。
20. 权利要求 14 的方法,其中添加所述化合物至约 10mM 至约 1M 的终浓度。
21. 权利要求 14 的方法,其中所述蛋白质是抗体。
22. 权利要求 14 的方法,其还包括冻干所述制剂的步骤。

23. 权利要求 14 的方法,其中存在于所述制剂中的蛋白质浓度为至少 100mg/ml。
24. 权利要求 14 的方法,其中所述制剂的粘度不超过 150cP。
25. 制备含有蛋白质的水性制剂的方法,所述方法包括向含有蛋白质的溶液中添加降低粘度量的能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物的步骤。
26. 权利要求 25 的方法,其中所述能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物选自精氨酸-HCl、精氨酸琥珀酸盐、精氨酸二肽、精氨酸三肽、聚精氨酸、高精氨酸、2-氨基-3-胍基-丙酸、胍、鸟氨酸、胍丁胺、胍基丁酸、尿素、瓜氨酸、N-羟基-L-缬氨酸、硝基精氨酸甲酯、精氨酸胍、精氨酸甲酯、精氨酸乙酯、赖氨酸、赖氨酸胍、赖氨酸甲酯、组氨酸、组氨酸甲酯、组胺、丙氨酸、丙氨酸胍、丙氨酸甲酯、腐胺、尸胺、亚精胺、精胺和甲硫氨酸。
27. 权利要求 25 的方法,其中添加所述化合物至至少 10mM 的终浓度。
28. 权利要求 25 的方法,其中添加所述化合物至至少 20mM 的终浓度。
29. 权利要求 25 的方法,其中添加所述化合物至至少 50mM 的终浓度。
30. 权利要求 25 的方法,其中添加所述化合物至至少 100mM 的终浓度。
31. 权利要求 25 的方法,其中添加所述化合物至约 10mM 至约 1M 的终浓度。
32. 权利要求 25 的方法,其中所述蛋白质是抗体。
33. 权利要求 25 的方法,其中存在于所述制剂中的蛋白质浓度为至少 100mg/ml。
34. 权利要求 25 的方法,其中所述制剂的粘度不超过 150cP。

用于降低含有蛋白质的制剂的粘度的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2010 年 5 月 3 日提交的美国临时专利申请系列号 61/330,689 的权益, 所述申请全文引入本文作为参考。

发明领域

[0003] 本申请涉及某些化合物包括例如某些带电荷的氨基酸及其结构类似物用于降低含有蛋白质的水性制剂的粘度的用途。相关的物质组合物及使用方法也预期包含在本发明之内。

发明背景

[0004] 基于蛋白质的治疗(包括基于抗体的治疗)通常定期施用,并且需要注射若干 mg/kg 剂量。皮下注射是施用这些治疗的典型途径。由于皮下注射所用的小体积(通常为 1.0ml-1.2ml),对于大剂量抗体治疗而言,这一施用途径需要生产高浓度的蛋白制剂(例如,50mg/ml-300mg/ml)。

[0005] 然而,高度浓缩的蛋白制剂的生产遇到了与蛋白质的物理和化学稳定性以及蛋白制剂难于制备、贮存和递送相关的挑战。一个问题是蛋白质在加工和/或贮存期间倾向于形成颗粒,这使得进一步加工期间的操作很困难。为消除这一问题,已将表面活性剂和/或糖加入到蛋白制剂中。尽管表面活性剂和糖可降低蛋白质的颗粒形成的程度,但它们没有解决与操作及施用浓缩蛋白制剂相关的另一问题,即粘度增加。实际上,糖可增强蛋白质内或蛋白质之间的分子间相互作用,或可产生糖分子之间的相互作用,并增加蛋白制剂的粘度。

[0006] 蛋白制剂升高的粘度对从加工到药物递送至患者都具有负面影响。进行了许多的尝试以研究粘度降低剂对高度浓缩的含有蛋白质的水性制剂的作用(例如,参见美国专利号 6,875,432)。尽管进行了这些尝试,但本领域仍然持续地需要鉴定新的蛋白粘度降低剂,以及应用这些物质用于产生相对高浓度的蛋白制剂,该蛋白制剂具有适于生产、贮存以及治疗尤其是皮下施用的合适的低粘度。

发明概述

[0007] 本发明基于新的发现,即包括某些带电荷的氨基酸及其衍生物、前体或结构类似物在内的某些分子可用作含有蛋白质的制剂的添加剂,用于降低这些水性形式制剂的粘度。

[0008] 因此,一个方面,本发明涉及物质组合物 (composition of matter),其包含蛋白质和能够降低包含所述蛋白质的水性 (aqueous) 制剂的粘度的化合物。在一个实施方案中,该蛋白质是抗体。在另一实施方案中,能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物选自精氨酸(精氨酸-HCl 或存在琥珀酸根抗衡离子的精氨酸,例如精氨酸琥珀酸盐)、精氨酸二肽、精氨酸三肽、聚精氨酸、高精氨酸、2-氨基-3-胍基-丙酸、胍、鸟氨酸、胍丁胺、

胍基丁酸、尿素、瓜氨酸、N- 羟基 -L- 降 - 精氨酸、硝基精氨酸甲酯、精氨酸酰胺、精氨酸甲酯、精氨酸乙酯、赖氨酸、赖氨酸酰胺、赖氨酸甲酯、组氨酸、组氨酸甲酯、组胺、丙氨酸、丙氨酸酰胺、丙氨酸甲酯、腐胺、尸胺、亚精胺、精胺和甲硫氨酸。此类化合物可以以至少 10mM、优选至少 20mM、更优选至少 50mM、甚至更优选至少 100mM、甚至更优选约 10mM 至 1M 的浓度存在于制剂中。该组合物可以是水性或冻干形式的。在水性形式中，所述物质组合物可具有不超过约 150cP、优选不超过约 120cP、优选不超过约 100cP、优选不超过约 90cP、优选不超过约 80cP、优选不超过约 70cP、优选不超过约 60cP、优选不超过约 50cP、优选不超过约 40cP 的粘度。物质组合物中存在的总蛋白质浓度为至少 50mg/ml、优选至少 75mg/ml、更优选至少 100mg/ml、更优选至少 150mg/ml、更优选至少 200mg/ml、更优选至少 250mg/ml、更优选至少 300mg/ml。

[0009] 本发明另一方面涉及制品 (article of manufacture)，其包含容纳有本文描述的任何物质组合物的容器。

[0010] 另一方面，提供了用于降低含有蛋白质的制剂粘度的方法，其中该方法包括向制剂中添加降低粘度量的能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物的步骤。在一个实施方案中，所述蛋白质是抗体。在另一实施方案中，能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物选自精氨酸（精氨酸-HCl 或存在琥珀酸根抗衡离子的精氨酸，例如精氨酸琥珀酸盐）、精氨酸二肽、精氨酸三肽、聚精氨酸、高精氨酸、2- 氨基 -3- 胍基 - 丙酸、胍、鸟氨酸、胍丁胺、胍基丁酸、尿素、瓜氨酸、N- 羟基 -L- 降 - 精氨酸、硝基精氨酸甲酯、精氨酸酰胺、精氨酸甲酯、精氨酸乙酯、赖氨酸、赖氨酸酰胺、赖氨酸甲酯、组氨酸、组氨酸甲酯、组胺、丙氨酸、丙氨酸酰胺、丙氨酸甲酯、腐胺、尸胺、亚精胺、精胺和甲硫氨酸。可添加此类化合物至制剂中，达到至少 10mM、优选至少 20mM、更优选至少 50mM、甚至更优选至少 100mM、甚至更优选约 10mM 至 1M 的终浓度。在一个实施方案中，该方法还包括在添加能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物之后冻干该制剂的步骤。在水性形式中，该制剂可具有不超过约 150cP、优选不超过约 120cP、优选不超过约 100cP、优选不超过约 90cP、优选不超过约 80cP、优选不超过约 70cP、优选不超过约 60cP、优选不超过约 50cP、优选不超过约 40cP 的粘度。制剂中存在的总蛋白质浓度为至少 50mg/ml、优选至少 75mg/ml、更优选至少 100mg/ml、更优选至少 150mg/ml、更优选至少 200mg/ml、更优选至少 250mg/ml、更优选至少 300mg/ml。

[0011] 在另一方面，提供了制备含有蛋白质的水性制剂的方法，其中该方法包括向制剂中添加降低粘度量的能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物的步骤。在一个实施方案中，蛋白质是抗体。在另一实施方案中，能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物选自精氨酸（精氨酸-HCl 或存在琥珀酸根抗衡离子的精氨酸，例如精氨酸琥珀酸盐）、精氨酸二肽、精氨酸三肽、聚精氨酸、高精氨酸、2- 氨基 -3- 胍基 - 丙酸、胍、鸟氨酸、胍丁胺、胍基丁酸、尿素、瓜氨酸、N- 羟基 -L- 降 - 精氨酸、硝基精氨酸甲酯、精氨酸酰胺、精氨酸甲酯、精氨酸乙酯、赖氨酸、赖氨酸酰胺、赖氨酸甲酯、组氨酸、组氨酸甲酯、组胺、丙氨酸、丙氨酸酰胺、丙氨酸甲酯、腐胺、尸胺、亚精胺、精胺和甲硫氨酸。可添加此类化合物至制剂中，达到至少 10mM、优选至少 20mM、更优选至少 50mM、甚至更优选至少 100mM、甚至更优选约 10mM 至 1M 的终浓度。在水性形式中，该制剂可具有不超过约 150cP、优选不超过约 120cP、优选不超过约 100cP、优选不超过约 90cP、优选不超过约 80cP、优选不超过约 70cP、优选不超过

约 60cP、优选不超过约 50cP、优选不超过约 40cP 的粘度。制剂中存在的总蛋白质浓度为至少 50mg/ml、优选至少 75mg/ml、更优选至少 100mg/ml、更优选至少 150mg/ml、更优选至少 200mg/ml、更优选至少 250mg/ml、更优选至少 300mg/ml。

[0012] 阅读这一专利说明书后,其他实施方案将变得显而易见。

[0013] 优选实施方案详述

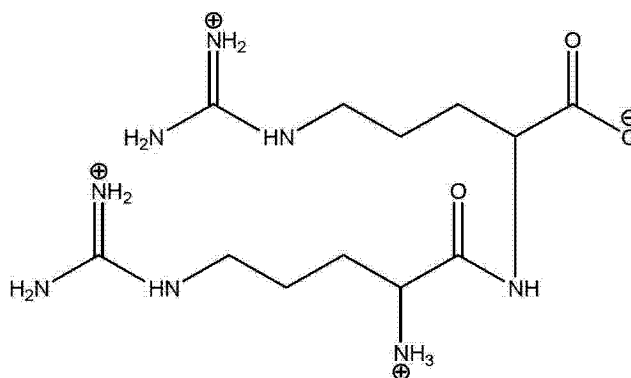
[0014] 通过参考以下具体实施方案详述以及其中包括的实施例,本发明将更容易理解。

[0015] 除非另外定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文描述的类似或等价的任意方法和材料均可用于实施或测试本发明,但以下描述了优选的方法和材料。本文提及的所有出版物均在此全文引入本文作为参考。

[0016] 本发明基于新的发现,即某些化合物,包括例如某些带电荷的氨基酸及其结构类似物,可用于降低含有蛋白质的水性制剂的粘度。因此,一个方面,本发明描述了物质组合物,其包含蛋白质和能够降低包含所述蛋白质的水性制剂的粘度的化合物。在某些实施方案中,本文鉴定为能够降低包含蛋白质的水性制剂的粘度的化合物包括例如:

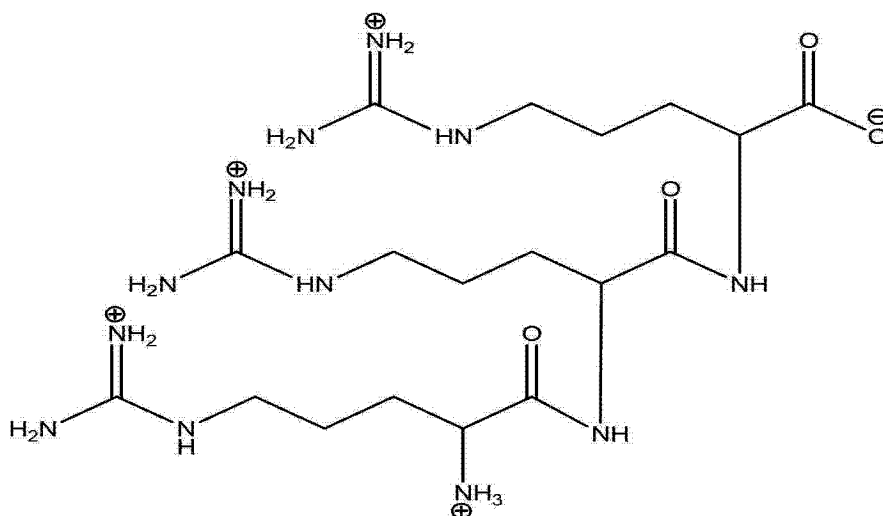
[0017] 精氨酸二肽

[0018]



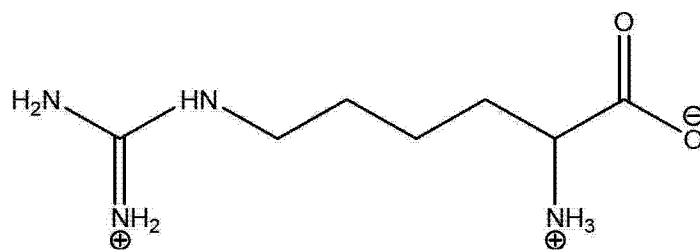
[0019] 精氨酸三肽

[0020]

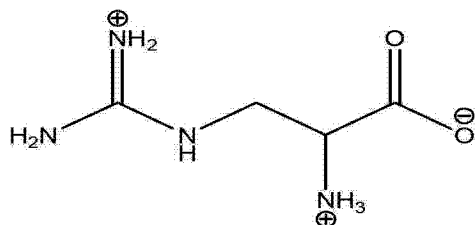


[0021] 高精氨酸

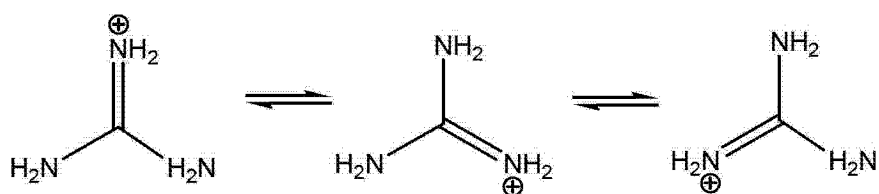
[0022]

[0023] 2-氨基-3-胍基-丙酸

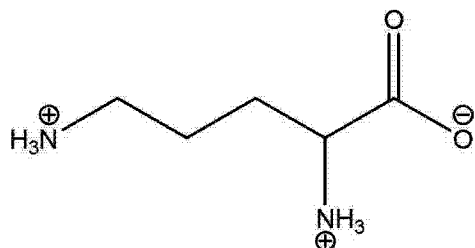
[0024]

[0025] 胍

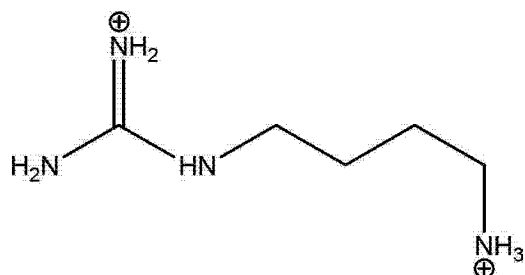
[0026]

[0027] 鸟氨酸

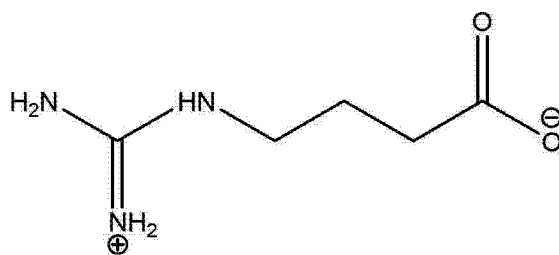
[0028]

[0029] 胍丁胺

[0030]

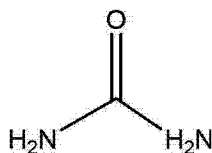
[0031] 胍基丁酸

[0032]



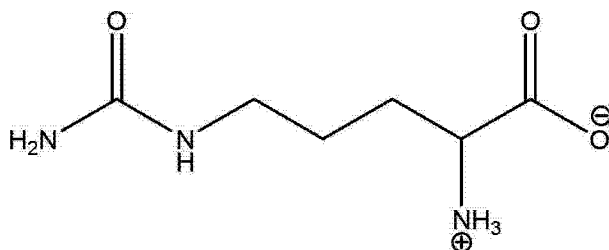
[0033] 尿素

[0034]



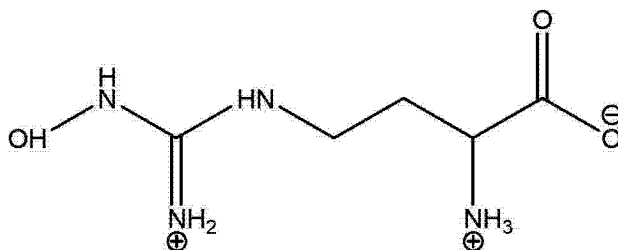
[0035] 瓜氨酸

[0036]



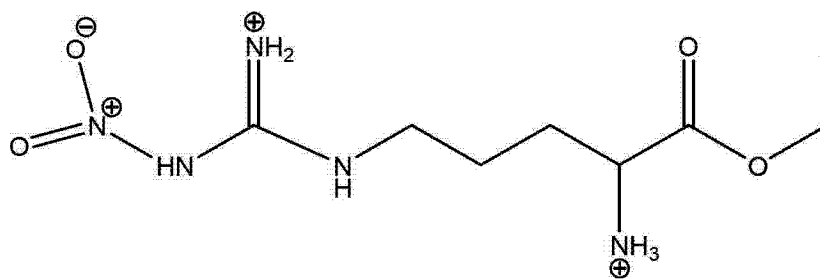
[0037] N-羟基-L-降-精氨酸

[0038]



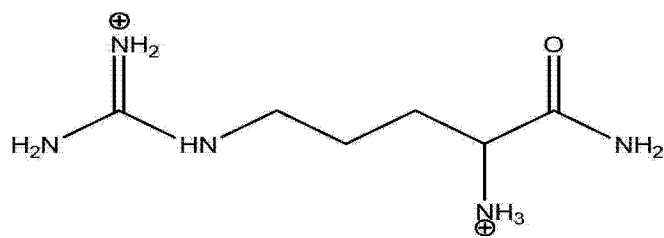
[0039] 硝基精氨酸甲酯

[0040]

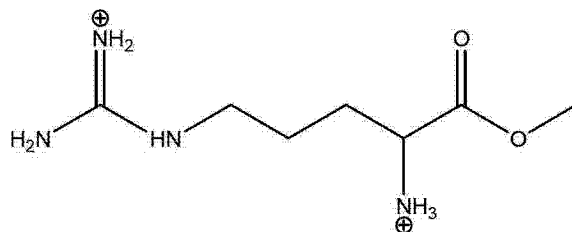


[0041] 精氨酸酰胺

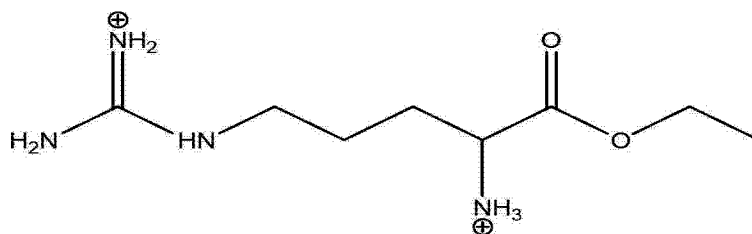
[0042]

[0043] 精氨酸甲酯

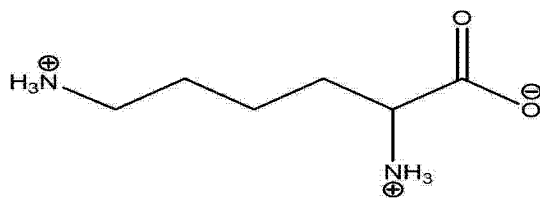
[0044]

[0045] 精氨酸乙酯

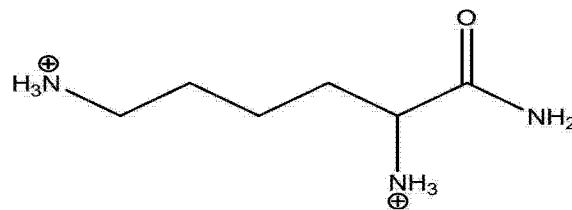
[0046]

[0047] 赖氨酸

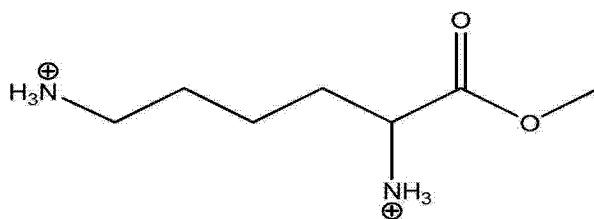
[0048]

[0049] 赖氨酸酰胺

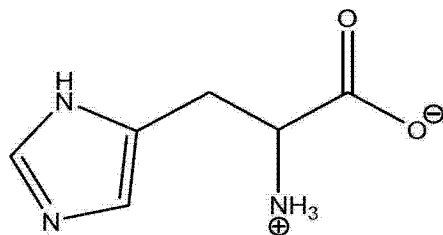
[0050]

[0051] 赖氨酸甲酯

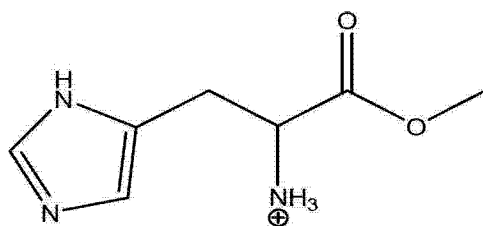
[0052]

[0053] 组氨酸

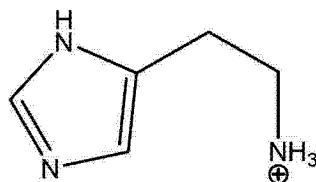
[0054]

[0055] 组氨酸甲酯

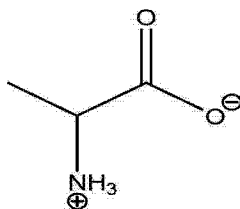
[0056]

[0057] 组胺

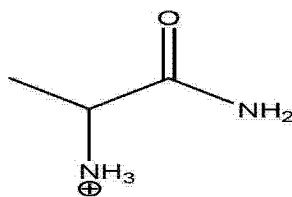
[0058]

[0059] 丙氨酸

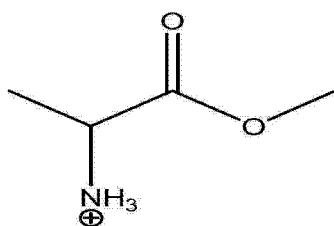
[0060]

[0061] 丙氨酰胺

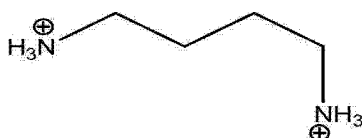
[0062]

[0063] 丙氨酸甲酯

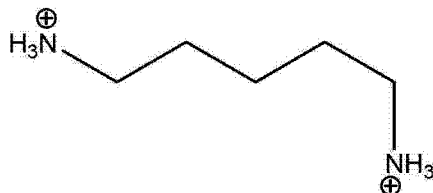
[0064]

[0065] 腐胺

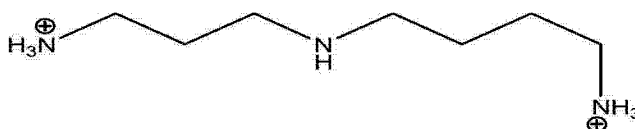
[0066]

[0067] 尸胺

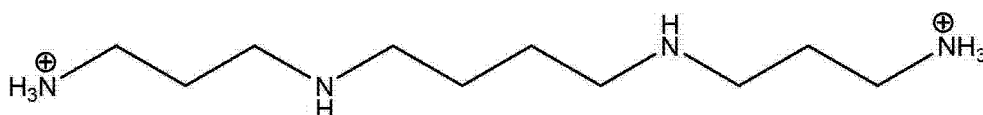
[0068]

[0069] 亚精胺

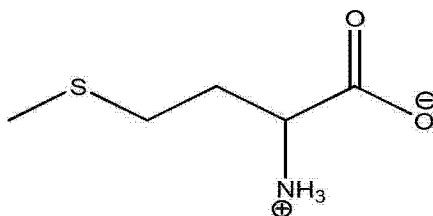
[0070]

[0071] 精胺

[0072]

[0073] 甲硫氨酸

[0074]



[0075] 上述化合物可单独地作为粘度降低剂使用,或可与其他粘度降低剂组合使用。可添加此类化合物至含有蛋白质的制剂中,达到至少 10mM、优选至少 20mM、更优选至少 50mM、甚至更优选至少 100mM、甚至更优选约 10mM 至 1M 的终浓度(单独地或组合地)。

[0076] 一般地,本发明的粘度降低剂可用于降低含有蛋白质的制剂的粘度,其中在该制剂中的蛋白质浓度为至少 50mg/ml、优选至少 75mg/ml、更优选至少 100mg/ml、更优选至少 150mg/ml、更优选至少 200mg/ml、更优选至少 250mg/ml、更优选至少 300mg/ml。

[0077] 在水性形式中,该含有蛋白质的制剂(添加能够降低含有蛋白质的水性制剂的粘度的化合物之后)可具有不超过约 150cP、优选不超过约 120cP、优选不超过约 100cP、优选不超过约 90cP、优选不超过约 80cP、优选不超过约 70cP、优选不超过约 60cP、优选不超过约 50cP、优选不超过约 40cP 的粘度。

[0078] “多肽”或“蛋白质”是指其链长足以产生较高水平的三级结构和/或四级结构的氨基酸序列。因此,蛋白质区别于也是基于氨基酸的分子但没有此类结构的“肽”。通常,本文所使用的蛋白质具有至少约 5-20kD、或者至少约 15-20kD、优选至少约 20kD 的分子量。“肽”是指通常不展现出较高水平的三级结构和/或四级结构的氨基酸序列。肽通常具有少

于约 5kD 的分子量。

[0079] 包括在本文定义之内的多肽的实例包括哺乳动物蛋白质,例如,肾素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素 A 链;胰岛素 B 链;胰岛素原;滤泡刺激激素;降钙素;黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子,如因子 VIII C、因子 IX、组织因子和血管性血友病因子(von Willebrands factor);抗凝血因子如蛋白质 C;心钠素;肺表面活性剂;纤溶酶原激活物,如尿激酶或者人尿或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和- β ;脑啡肽酶;RANTES(活化正常 T 细胞表达和分泌的调节因子(regulated on activation normally T-cell expressed and secreted));人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白如人血清白蛋白;穆勒氏(Muellerian)抑制物;松弛素 A 链;松弛素 B 链;松弛素原(prorelaxin);鼠促性腺素相关肽;微生物蛋白,诸如 β -内酰胺酶;脱氧核糖核酸酶(DNase);IgE;细胞毒 T-淋巴细胞相关抗原(CTLA),如 CTLA-4;抑制素;活化素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;蛋白质 A 或 D;类风湿因子;神经营养因子如骨衍生的神经营养因子(BDNF)、神经营养蛋白-3、-4、-5 或 -6(NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6),或神经生长因子如 NGF- β ;血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子如 aFGF 和 bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF)如 TGF- α 和 TGF- β ,包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5;胰岛素样生长因子-I 和 -II(IGF-I 和 IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑 IGF-I);胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBPs);CD 蛋白,如 CD3、CD4、CD8、CD19 和 CD20;促红细胞生长素;骨诱导因子(osteoinductive factors);免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);干扰素,如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF;白细胞介素(IL),如 IL-1 至 IL-10;超氧化物歧化酶;T 细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原,例如 AIDS 外膜的部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;整联蛋白,如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 和 VCAM;肿瘤相关抗原,如 CA125(卵巢癌抗原)或 HER2、HER3 或 HER4 受体;免疫粘附素;以及上述任何蛋白的片段和/或变体,以及与上述任何蛋白结合的抗体包括抗体片段。

[0080] 配制的蛋白质优选是基本上纯的,以及最好基本上是同质的(即没有污染蛋白)。“基本上纯的”蛋白质意指以组合物的总重量计包含至少约 90%(重量)蛋白质、优选为至少约 95%(重量)蛋白质的组合物。“基本上同质”的蛋白质意指以组合物的总重量计,包含至少约 99%(重量)的蛋白质的组合物。

[0081] 在某些实施方案中,所述蛋白质是抗体。本文的抗体针对所关注的“抗原”。优选的,所述抗原是生物学上重要的蛋白质,并且施用所述抗体至罹患疾病或病症的哺乳动物可在该哺乳动物中产生治疗益处。然而,也还考虑针对非蛋白抗原(如肿瘤相关糖脂抗原,参见美国专利 5,091,178)的抗体。当抗原是蛋白质时,其可以是跨膜分子(例如受体),或配体,如生长因子。示例性的抗原包括上文讨论的那些蛋白质。本发明包括的抗体的优选分子靶标包括 CD 多肽,如 CD3、CD4、CD8、CD19、CD20 和 CD34;HER 受体家族的成员,如 EGF 受体(HER1)、HER2、HER3 或 HER4 受体;细胞粘附分子,如 LFA-1、Mac1、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM 和 α v/ β 3 整联蛋白,包括它的 α 或 β 亚基(如,抗-CD11a、抗-CD18 或抗 CD11b 抗体);生长因子如 VEGF;IgE;血型抗原;flk2/flt3 受体;肥胖(OB)受体;mp1 受体;CTLA-4;多肽 C 等。可溶抗原或其片段(任选与其他分子缀合的)可用作免疫原用于产生抗体。对于跨

膜分子,诸如受体,则它们的片段(例如,受体的细胞外结构域)可用作免疫原。或者,表达所述跨膜分子的细胞可用作免疫原。此类细胞可衍生自天然来源(例如,癌细胞系)或可以通过重组技术进行转化以表达所述跨膜分子的细胞。

[0082] 本文中被纯化的抗体的实例包括但不限于:HER2 抗体,包括曲妥珠单抗(**HERCEPTIN®**) (Carter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289(1992), 美国专利号 5,725,856) 以及培妥珠单抗 (OMNITARG™) (W001/00245); CD20 抗体(参见下面); IL-8 抗体 (St John 等, Chest, 103:932(1993), 以及国际公开号 W095/23865); VEGF 或 VEGF 受体抗体, 包括人源化和 / 或亲和力成熟的 VEGF 抗体, 如人源化 VEGF 抗体 huA4.6.1 贝伐珠单抗(**AVASTIN®**)和雷珠单抗(**LUCENTIS®**) (Kim 等, Growth Factors, 7:53-64(1992), 国际公开号 W096/30046, 以及 W098/45331, 1998 年 10 月 15 日公开); PSCA 抗体 (W001/40309); CD11a 抗体, 包括依法珠单抗(**RAPTIVA®**) (美国专利号 6,037,454, 美国专利号 5,622,700, W098/23761, Stoppa 等, Transplant Intl. 4:3-7(1991), 以及 Hourmant 等, Transplantation 58:377-380(1994)); 与 IgE 结合的抗体, 包括奥马佐单抗(**XOLAIR®**) (Presta 等, J. Immunol. 151:2623-2632(1993), 以及国际公开号 W095/19181; 1998 年 2 月 3 日授权的美国专利号 5,714,338, 或 1992 年 2 月 25 日授权的美国专利号 5,091,313, 1993 年 3 月 4 日公开的 W093/04173, 或 1998 年 6 月 30 日提交的国际申请号 PCT/US98/13410, 美国专利号 5,714,338); CD18 抗体 (1997 年 4 月 22 日授权的美国专利号 5,622,700, 或 1997 年 7 月 31 日公开的 W097/26912); Apo-2 受体抗体 (1998 年 11 月 19 日公开的 W098/51793); 组织因子 (TF) 抗体 (1994 年 11 月 9 日授权的欧洲专利号 0420937B1); α_4 - α_7 整联蛋白抗体 (1998 年 2 月 19 日公开的 W098/06248); EGFR 抗体 (例如, 嵌合或人源化 225 抗体, 西妥昔单抗, **ERBUTIX®**, 在 1996 年 12 月 19 日公开的 W096/40210 中); CD3 抗体, 诸如 OKT3 (1985 年 5 月 7 日授权的美国专利号 4,515,893); CD25 或 Tac 抗体, 诸如 CHI-621 (**SIMULECT®**) 和 **ZENAPAX®** (参见 1997 年 12 月 2 日授权的美国专利号 5,693,762); CD4 抗体, 诸如 cM-7412 抗体 (Choy 等, Arthritis Rheum 39(1):52-56(1996)); CD52 抗体, 诸如 CAMPATH-1H (ILEX/Berlex) (Riechmann 等, Nature 332:323-337(1988)); Fc 受体抗体, 诸如 M22 抗体, 其针对 Fc γ RI 如在 Graziano 等, J. Immunol. 155(10):4996-5002(1995) 中); 癌胚抗原 (CEA) 抗体, 诸如 hMN-14 (Sharkey 等, Cancer Res. 55(23Suppl):5935s-5945s(1995)); 针对乳腺上皮细胞的抗体, 包括 huBrE-3、hu-Mc3 和 CHL6 (Ceriani 等, Cancer Res. 55(23):5852s-5856s(1995); 以及 Richman 等, Cancer Res. 55(23Suppl):5916s-5920s(1995)); 与结肠癌细胞结合的抗体, 诸如 C242 (Litton 等, EurJ. Immunol. 26(1):1-9(1996)); CD38 抗体, 例如 AT13/5 (Ellis 等, J. Immunol. 155(2):925-937(1995)); CD33 抗体, 诸如 Hu M195 (Jurcic 等, Cancer Res. 55(23Suppl):5908s-5910s(1995)) 以及 CMA-676 或 CDP771; EpCAM 抗体, 诸如 17-1A (**PANOREX®**); GpIIb/IIIa 抗体, 诸如阿昔单抗或 c7E3Fab (**REOPRO®**); RSV 抗体, 诸如 MEDI-493 (**SYNAGIS®**); CMV 抗体, 诸如 **PROTOVIR®**; HIV 抗体, 诸如 PR0542; 肝炎抗体, 诸如 Hep B 抗体 **OSTAVIR®**; CA125 抗体, 包括抗 -MUC16 (W02007/001851; Yin, BWT 和 Lloyd, KO, J. Biol. Chem. 276:27371-27375(2001))

以及 OvaRex ; 个体基因型 GD3 表位抗体 BEC2 ; α v β 3 抗体 (例如, **VITAXIN®**; Medimmune) ; 人肾细胞癌抗体, 诸如 ch-G250 ; ING-1 ; 抗 - 人 17-1An 抗体 (3622W94) ; 抗 - 人结肠直肠肿瘤抗体 (A33) ; 针对 GD3 神经节苷脂的抗 - 人黑色素瘤抗体 R24 ; 抗 - 人鳞状细胞癌 (SF-25) ; 人白细胞抗原 (HLA) 抗体, 诸如 Smart ID10 和抗 - HLA DR 抗体 Oncolym(Lym-1) ; CD37 抗体, 诸如 TRU016(Trubion) ; IL-21 抗体 (Zymogenetics/Novo Nordisk) ; 抗 - B 细胞抗体 (Impheron) ; B 细胞靶向的 MAb(Immunogen/Aventis) ; 1D09C3(Morphosys/GPC) ; LymphoRad131(HGS) ; Lym-1 抗体, 诸如 Lym-1Y-90(USC) 或 抗 - Lym-10ncolym(USC/Peregrine) ; LIF226(Enhanced Lifesci.) ; BAFF 抗体 (例如, W003/33658) ; BAFF 受体抗体 (例如 参见, W002/24909) ; BR3 抗体 ; Blys 抗体, 诸如 贝利木单抗 (belimumab) ; LYMPHOSTAT-B™ ; ISF154(UCSD/Roche/Tragen) ; 戈利昔单抗 (gomilixima)(Idec152;Biogen Idec) ; IL-6 受体抗体, 诸如 atlizumab(ACTEMRA™;Chugai/Roche) ; IL-15 抗体, 诸如 HuMax-IL-15(Genmab/Amgen) ; 趋化因子受体抗体, 诸如 CCR2 抗体 (例如, MLN1202;Milliennium) ; 抗 - 补体抗体, 诸如 C5 抗体 (例如, 依库珠单抗 (eculizumab), 5G1.1;Alexion) ; 人免疫球蛋白的口服制剂 (例如, IgP0;Protein Therapeutics) ; IL-12 抗体, 诸如 ABT-874(CAT/Abbott) ; 替奈昔单抗 (Teneliximab) (BMS-224818;BMS) ; CD40 抗体, 包括 S2C6 及其人源化变体 (W000/75348) 和 TNX100(Chiron/Tanox) ; TNF- α 抗体, 包括 cA2 或 英夫利昔单抗 (**REMICADE®**)、CDP571、MAK-195、阿达木单抗 (HUMIRA™), PEG 化 TNF- α 抗体片段, 诸如 CDP-870(Celltech), D2E7(Knoll), 抗 - TNF- α 多克隆抗体 (例如, PassTNF;Verigen) ; CD22 抗体, 诸如 LL2 或 依帕珠单抗 (**LYMPHOCIDE®**; Immunomedics), 包括 依帕珠单抗 Y-90 和 依帕珠单抗 I-131, Abiogen's CD22 抗体 (Abiogen, Italy), CMC544(Wyeth/Celltech), combotox(UT Southwestern), BL22(NIH), 以及 LympoScan Tc99(Immunomedics)。

[0083] CD20 抗体的实例包括 : “C2B8”, 其现在称为 “利妥昔单抗” (“**RITUXAN®**”) (美国专利号 5, 736, 137) ; 钇 - [90] - 标记的 2B8 鼠抗体, 称为 “Y2B8” 或 “替伊莫单抗 (Ibritumomab Tiuxetan)” (**ZEVALIN®**), 可从 IDEC Pharmaceuticals, Inc. 商业获得 (美国专利号 5, 736, 137 ; 1993 年 6 月 22 日在 ATCC 以登录号 HB11388 保藏的 2B8) ; 鼠 IgG2a “B1”, 也称为 “托西莫单抗”, 任选地用 ¹³¹I 标记, 以产生 “131I-B1” 或 “碘 I131 托西莫单抗” 抗体 (BEXXAR™), 其可从 Corixa 商业获得 (也参见美国专利号 5, 595, 721) ; 鼠单克隆抗体 “1F5” (Press 等, Blood69(2) : 584-591(1987)) 及其变体, 包括 “框架修补 (framework patched)” 或人源化 1F5(W02003/002607, Leung, S. ; ATCC 保藏 HB-96450) ; 鼠 2H7 和 嵌合 2H7 抗体 (美国专利号 5, 677, 180) ; 人源化 2H7(W02004/056312, Lowman 等) ; 2F2(HuMax-CD20), 其为完全的人高亲和抗体, 靶向 B 细胞细胞膜中的 CD20 分子 (Genmab, Denmark ; 例如 参见, Glennie and van de Winkel, Drug Discovery Today8:503-510(2003) 以及 Cragg 等, Blood101:1045-1052(2003) ; W02004/035607 ; US2004/0167319) ; W02004/035607 和 US2004/0167319 中所示的人单克隆抗体 (Teeling 等) ; US2004/0093621 中描述的具有与 Fc 区域结合的复杂 N-糖苷连接的糖链的抗体 (Shitara 等) ; 与 CD20 结合的单克隆抗体或抗原结合片段 (W02005/000901, Tedder 等), 诸如 HB20-3、HB20-4、HB20-25 和 MB20-11 ; CD20 结合分子, 诸如 AME 系列抗体, 例

如 W02004/103404 和 US2005/0025764 中所示的 AME33 抗体 (Watkins 等, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); CD20 结合分子, 诸如 US2005/0025764 (Watkins 等) 中描述的那些; A20 抗体或其变体, 诸如嵌合或人源化 A20 抗体 (分别为 cA20、hA20) 或 IMM-106 (US2003/0219433, Immunomedics); CD20- 结合抗体, 包括去除表位的 Leu-16、1H4 或 2B8, 任选地与 IL-2 缀合, 如在 US2005/0069545A1 和 W02005/16969 (Carr 等) 中的那样; 与 CD22 和 CD20 结合的双特异性抗体, 例如 hLL2xhA20 (W02005/14618, Chang 等); 可从 International Leukocyte Typing Workshop 获得的单克隆抗体 L27、G28-2、93-1B3、B-C1 或 NU-B2 (Valentine 等, In: Leukocyte Typing III (McMichael, 编辑, p. 440, Oxford University Press (1987))); 1H4 (Haisma 等, Blood 92:184 (1998)); 抗-CD20 auristatin E 缀合物 (Seattle Genetics); 抗-CD20-IL2 (EMD/Biovation/City of Hope); 抗-CD20MAb 治疗 (EpiCyte); 抗-CD20 抗体 TRU015 (Trubion)。

[0084] 本文使用的术语“抗体”包括单克隆抗体 (包括具有免疫球蛋白 Fc 区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体)、双抗体 (diabodies)/ 肽抗体 (peptibodies) 和单链分子, 以及抗体片段 (例如, Fab、F(ab')₂ 和 Fv), 其任一个均可任选地与另一成分例如毒素缀合。术语“免疫球蛋白” (Ig) 在本文中可与“抗体”互换地使用。

[0085] 基本的 4 链抗体单位是由两条相同的轻 (L) 链和两条相同的重 (H) 链组成的异四聚体糖蛋白。IgM 抗体由 5 个基本的异四聚体单位与另外的称为 J 链的多肽组成, 并且包含 10 个抗原结合位点, 而 IgA 抗体包含 2-5 个基本的 4 链单位, 其中所述的基本的 4 链单位能与 J 链一起聚合形成多价的集合物 (assemblages)。对于 IgG 来说, 4 链单位一般约为 150,000 道尔顿。每条 L 链通过一个共价二硫键与 H 链相连, 而两条 H 链取决于 H 链同种型通过一个或多个二硫键相互连接。每条 H 和 L 链也具有有规则地间隔的链内二硫键。每条 H 链在 N- 末端具有可变域 (V_H), 对于 α 和 γ 链各自继之以三个恒定域 (C_H), 对于 μ 和 ϵ 同种型继之以四个 C_H 域。每条 L 链在 N- 末端具有可变域 (V_L), 在另一个末端继之以恒定域。V_L 与 V_H 相对应 (align), 而 C_L 与重链的第一个恒定域 (C_{H1}) 相对应。认为特殊的氨基酸残基形成轻链和重链可变域之间的界面。V_H 和 V_L 的配对一同形成了单一抗原结合位点。对于不同类型的抗体的结构和性质, 参见例如, Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, 第 71 页和第 6 章。

[0086] 来自任何脊椎动物物种的 L 链可以根据它们恒定域的氨基酸序列被分为两种明显不同类型中的一种, 称为 κ 和 λ 。取决于它们的重链恒定域 (CH) 的氨基酸序列, 免疫球蛋白可以被分为不同的类型或同种型。有五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 分别具有被命名为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。根据 CH 的序列和功能方面的相对小的差异, γ 和 α 类被进一步分成亚类, 例如, 人类表达以下的亚类: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0087] 术语“可变”是指在抗体之间可变域的某些片段在序列上有很大差异的事实。V 结构域介导抗原结合并决定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而, 可变性在整个可变域中不是均匀分布的。而是, V 区由被极度可变的称为“高变区”或有时称为“互补决定区” (CDR) 的较短区域 (每个长度约 9-12 个氨基酸残基) 分隔的相对不变的区域组成, 该相对不变

的区域被称为框架区 (FR), 具有约 15-30 个氨基酸残基。天然重链和轻链的可变域各自都包含四个 FR, 大多采取 β -折叠构型, 通过三个高变区连接, 高变区形成环形连接, 有些情况下形成 β -折叠结构的部分。每条链中的高变区通过 FR 紧密邻近地保持在一起, 并且与来自另一链的高变区一同, 促成抗体的抗原结合位点的形成 (见 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。恒定域没有直接参与抗体与抗原的结合, 但是显示出各种效应子作用, 诸如参与抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0088] 当在本文中使用时, 术语“高变区”(也称为“互补决定区”或 CDR) 是指位于免疫球蛋白 V 区结构域内的抗体氨基酸残基 (通常为三个或四个极度序列可变性的短区域), 其形成抗原结合位点, 并且是抗原特异性主要决定因素。有至少两种方法来鉴定 CDR 残基: (1) 基于跨物种 (cross-species) 序列可变性的方法 (即, Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1991)); 和 (2) 基于抗原抗体复合物的结晶学研究的方法 (Chothia, C. 等, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。然而, 就两种残基鉴定技术确定重叠的区域而不是相同的区域而言, 可以组合它们来确定杂混 (hybrid) CDR。

[0089] 本文所用的术语“单克隆抗体”指的是从一群基本上均一的抗体中获得的抗体, 即除了少量存在的可能发生的天然突变和 / 或翻译后修饰 (即, 异构化、酰胺化) 外, 群体中包含的个体抗体是相同的。单克隆抗体对单一的抗原位点有高度的特异性。而且, 与通常包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的常规 (多克隆) 抗体制备物不同, 每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了特异性外, 单克隆抗体的优点是它们是用杂交瘤培养物来合成的, 不被其它免疫球蛋白污染。修饰词“单克隆”指明从基本上均一的抗体种群中获得的抗体的特征, 不应被理解为需要任何特殊的方法来生产抗体。例如, 本发明所用的单克隆抗体可用首先在 Kohler 等, *Nature*, 256:495 (1975) 中描述的杂交瘤方法来制备, 或可用重组 DNA 方法来制备 (见美国专利号 4,816,567)。“单克隆抗体”也可用例如 Clackson 等, *Nature*, 352:624-628 (1991) 和 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 描述的技术从噬菌体抗体库中分离获得。

[0090] 本文的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体 (免疫球蛋白), 该“嵌合”抗体中重链和 / 或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 而所述链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体种类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 还包括该抗体的片段, 只要它们显示出期望的生物学活性 (美国专利号 4,816,567; Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))。本文感兴趣的嵌合抗体包括“灵长类化 (primitized)”的抗体, 其包含来源于非人灵长类动物 (例如, 旧大陆猴 (Old World Monkey)、猿 (Ape) 等) 的可变域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0091] “完整”抗体是包含抗原结合位点以及 CL 和至少重链结构域 C_H1、C_H2 和 C_H3 的抗体。恒定域可以是天然序列的恒定域 (例如, 人类天然序列恒定域) 或其氨基酸序列变体。优选地, 完整抗体具有一种或多种效应子作用。

[0092] “抗体片段”包括完整抗体的一部分, 优选包括完整抗体的抗原结合区和 / 或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段; 双抗体; 线性抗体 (参见美国专利号 5,641,870, 实施例 2; Zapata 等, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 [1995]); 单链抗体分

子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0093] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,以及残余的“Fc”片段,该命名反映易于结晶的能力。Fab 片段由完整的 L 链以及 H 链的可变区结构域 (VH) 和一条重链的第一个恒定域 (C_H1) 组成。每个 Fab 片段对于抗原结合是单价的,即它具有单个抗原结合位点。抗体的胃蛋白酶处理产生单个大的 F(ab')₂ 片段,其大略地相应于具有不同抗原结合活性的两个二硫化物连接的 Fab 片段,并仍能够交联抗原。Fab' 片段与 Fab 片段的不同在于其在 C_H1 结构域的羧基末端具有几个额外的残基,包括一个或多个来自抗体绞链区的半胱氨酸。Fab'-SH 在本文中是指其中恒定域的半胱氨酸残基携带有游离硫醇基的 Fab'。F(ab')₂ 抗体片段最初作为 Fab' 片段的成对物而产生,其在 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0094] Fc 片段包含由二硫键连接的两个 H 链的羧基末端部分。抗体的效应子作用由 Fc 区的序列决定,该区也是在某些类型的细胞上发现的被 Fc 受体 (FcR) 识别的区域。

[0095] “Fv”是含有完整的抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。此片段由紧密地非共价连接的一个重链可变域与一个轻链可变域的二聚体组成。这些两个结构域的折叠产生 6 个高变环 (H 和 L 链各 3 个环),其提供用于抗原结合的氨基酸残基,并且对抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域 (或仅含有 3 个抗原特异性 CDR 的 F_v 的一半) 也具有识别和结合抗原的能力,尽管与完整的结合位点相比其亲和力较低。

[0096] “单链 Fv”也可简写成“sFv”或“scFv”,其为包括连接进单个多肽链的 V_H 和 V_L 抗体结构域的抗体片段。优选地, sFv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽连接体,其能使 sFv 形成抗原结合所需的结构。关于 sFv 的综述见 Pluckthun 在《单克隆抗体的药理学 (The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)》,第 113 卷, Rosenburg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994)。

[0097] 术语“双抗体”是指如下制备的小的抗体片段,用短连接体 (约 5-10) 残基) 在 V_H 和 V_L 结构域之间构建 sFv 片段 (参见前段),因而获得链间而不是链内的 V 结构域对而制得,从而得到二价的片段,即,具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉 (crossover)” sFv 片段的异二聚体,其中所述两个抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同的多肽链上。双抗体在例如 EP404,097 ; W093/11161 ; Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448 (1993) 中有更详细的描述。

[0098] 本发明的抗体还可包括人源化抗体或人抗体。非-人 (例如,鼠) 抗体的人源化形式是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段 (如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合子序列 (subsequences)), 它们包含最小的来源于非人免疫球蛋白的序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白 (受者抗体), 其中受者互补决定区 (CDR) 的残基被具有所需特异性、亲和力和性能的小鼠、大鼠、兔等非人物种抗体 (供体抗体) 的 CDR 残基所替代。在一些实例中,人免疫球蛋白的 Fv 框架区残基由相应的非人类残基所替代。人源化抗体也可包含受者抗体或引入的 CDR 或框架序列中均不存在的残基。通常,人源化抗体基本上包括至少一个 (通常两个) 可变域的全部,其中 CDR 区的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的那些,而 FR 区的全部或基本上全部是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体最理想地还将包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分,典型地包含人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分 [Jones 等, Nature, 321:522-525 (1986) ; Riechmann

等, *Nature*, 332:323-329(1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596(1992)]。

[0099] 非-人抗体的人源化方法是本领域技术人员众所周知的。通常,人源化抗体具有已导入的一个或多个源自非人类的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基常称为“引入的”残基,它们通常来自“引入的”可变域。人源化基本按照 Winter 及其同事的方法 [Jones 等, *Nature*, 321:522-525(1986); Riechmann 等, *Nature*, 332:323-327(1988); Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536(1988)], 用一个或多个啮齿类 CDR 序列取代人类抗体的相应序列来进行。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号 4816567),其中基本上小于完整人类可变域的人类可变域被非人类物种的相应序列取代。实践中,人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基并可能有一些 FR 残基被啮齿类抗体中类似位点的残基取代的人抗体。

[0100] 当抗体意欲用于人治疗用途时,对用于制备人源化抗体的人可变域(轻链和重链两者)的选择对于降低免疫原性和 HAMA 反应(人抗-鼠抗体)是非常重要的。根据所谓的“最佳拟合(best-fit)”方法,针对已知的人类可变域序列的完整文库筛选啮齿动物抗体的可变域的序列。鉴定与啮齿动物的 V 结构域序列最接近的人类 V 结构域序列,并接受其中的人框架区(FR)用于人源化抗体(Sims 等, *J. Immunol.* 151:2296(1993); Chothia 等, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。另一种方法使用了特定的框架区,所述框架区来源于轻链或重链的特定亚群的所有人类抗体的共有序列。该相同的框架可被用于几个不同的人源化抗体(Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992); Presta 等, *J. Immunol.* 151:2623(1993))。

[0101] 还很重要,抗体被人源化后仍保持着对抗原的高结合亲和性及其它有利的生物学性质。为了实现这个目标,根据优选的方法,通过利用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念上的人源化产物的方法,来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,并为本领域技术人员所熟知。图解和显示选定的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。对这些显示结果的检查,使得能够分析在候选免疫球蛋白序列的功能中残基可能起的作用,即,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。这样,可以从受者和引入序列中选择和组合 FR 残基,从而获得期望的抗体特性,如对目标抗原的增加的亲和性。一般来讲,高变区残基直接并且最实质地影响抗原结合。

[0102] 各种形式的人源化抗体都在本发明考虑之内。例如,人源化抗体可以是抗体片段,例如 Fab,其任选地与一个或多个细胞毒性剂缀合以产生免疫缀合物。或者,人源化抗体可以是完整抗体,诸如完整的 IgG1 抗体。

[0103] 作为对人源化的备选,可以产生人类抗体。例如,现在可以制备转基因动物(如小鼠),所述转基因动物经免疫可以在没有内源性免疫球蛋白产生的情况下产生全套(a full repertoire of)人抗体。例如,已描述在嵌合和种系(germ-line)突变小鼠中,抗体重链连接区(JH)基因的同合型缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到此种系突变小鼠,一旦抗原攻击将导致产生人抗体。例如,见 Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551(1993); Jakobovits 等, *Nature*, 362:255-258(1993); Bruggemann 等, *Year in Immuno.* 7:33(1993); 美国专利号 5,545,806、5,569,825、5,591,669(均为 GenPharm 的); 5,545,807 以及 W097/17852。

[0104] 或者,可应用噬菌体展示技术(McCafferty 等, *Nature* 348:552-553[1990]) 从来

自未免疫供体的免疫球蛋白可变 (V) 域基因所有组成部分 (repertoires) 体外产生人抗体和抗体片段。依据这种技术, 抗体 V 结构域基因被框内 (in-frame) 克隆到丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因中, 并在噬菌体粒子的表面上展示为功能性抗体片段。由于所述丝状粒子包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝, 基于抗体功能性质的选择也导致了编码显示出那些性质的抗体的基因的选择。因而, 噬菌体模拟 B 细胞的一些性质。可以用各种形式 (format) 进行噬菌体展示, 例如这在 Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993) 中有综述。数种来源的 V 基因片段可被用于噬菌体展示。Clackson 等, *Nature*, 352:624-628 (1991) 从来源于免疫小鼠的脾的 V 基因的小的随机组合文库中分离了一组多样化抗恶唑酮抗体。基本上遵循 Marks 等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 或 Griffith 等, *EMBO J.* 12:725-734 (1993) 中描述的技术, 可以构建来自未免疫人类供体的 V 基因的所有组成部分, 并可以分离出针对一组多样化抗原 (包括自身抗原) 的抗体。还参见, 美国专利号 5, 565, 332 和 5, 573, 905。[0105] 也可在体外通过活化的 B 细胞来产生人抗体 (参见美国专利号 5, 567, 610 和 5, 229, 275)。

[0106] 双特异性抗体是对至少两个不同表位具有的结合特异性的抗体。示例性的双特异性抗体可与本文描述的蛋白的两个不同表位结合。其他此类抗体可组合有一个蛋白结合位点和对于另一蛋白的结合位点。备选地, 可以将一条抗蛋白臂以另一臂组合, 所述另一臂与白细胞上的触发分子结合, 所述触发分子诸如 T 细胞受体分子 (例如, CD3) (例如参见, Baeuerle, 等, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11 (1):22-30 (2009))、或 IgG 的 Fc 受体 (Fc γ R), 诸如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16), 从而将细胞防卫机制聚焦和定位到表达 TAT 的细胞上。双特异性抗体还可用于将细胞毒性剂定位至表达靶蛋白的细胞上。这些抗体拥有蛋白结合臂以及与细胞毒性剂 (例如, 皂草素、抗 - 干扰素 - α 、长春花生物碱、蓖麻毒素 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原) 结合的臂。双特异性抗体可作为全长抗体或抗体片段 (例如, F(ab')₂ 双特异性抗体) 而制备。

[0107] W096/16673 描述了双特异性抗 -ErbB2/ 抗 -Fc γ RIII 抗体, 以及美国专利号 5, 837, 234 公开了双特异性抗 -ErbB2/ 抗 -Fc γ RI。双特异性抗 -ErbB2/Fc α 抗体显示于 W098/02463 中。美国专利号 5, 821, 337 和 6, 407, 213 教导了双特异性抗 -ErbB2/ 抗 -CD3 抗体。还已描述了结合 CD3 抗原上的表位以及第二种表位的其他双特异性抗体。例如参见美国专利号 5, 078, 998 (抗 -CD3/ 肿瘤细胞抗原); 5, 601, 819 (抗 -CD3/IL-2R; 抗 -CD3/CD28; 抗 -CD3/CD45); 6, 129, 914 (抗 -CD3/ 恶性 B 细胞抗原); 7, 112, 324 (抗 -CD3/CD19); 6, 723, 538 (抗 -CD3/CCR5); 7, 235, 641 (抗 -CD3/EpCAM); 7, 262, 276 (抗 -CD3/ 卵巢肿瘤抗原) 以及 5, 731, 168 (抗 -CD3/CD4IgG)。

[0108] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产是基于两个免疫球蛋白重链 - 轻链对的共表达, 其中所述两个链具有不同的特异性 (Millstein 等, *Nature* 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机配合, 这些杂交瘤 (细胞杂交瘤 (quadromas)) 产生 10 种不同抗体分子的潜在混合物, 在其中仅有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行正确分子的纯化, 这是相当繁琐的, 并且产物产率很低。在 W093/08829 和 Traunecker 等, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) 中公开了类似的方法。

[0109] 根据不同的方法,将具有期望的结合特异性的抗体可变域(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定域序列融合。优选地,所述融合是与包含至少铰链、CH2 和 CH3 域的部分的 Ig 重链恒定域的融合。优选地,至少所述融合物之一中存有包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物的 DNA,并且如果需要将编码免疫球蛋白轻链的 DNA,插入到独立的表达载体中,共转染到适合的宿主细胞中。当用于构建的所述三个多肽链的不等比例提供了期望的双特异性抗体的最适产量时,这为实施方案中调整所述三个多肽片段的相互比例提供了更大的灵活性。然而,当至少两个多肽链以相等的比例表达导致高产量时,或当比例对期望的链组合的产量没有显著影响时,可以将两个或全部三个多肽链编码序列插入到一个表达载体中。

[0110] 在这一方法的优选实施方案中,所述双特异性抗体由在一条臂上具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链、和在另一条臂上的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。已发现,这种不对称的结构便于从不需要的免疫球蛋白链组合中分离期望的双特异性化合物,因为仅在所述双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链提供了容易的分离方法。在 W094/04690 中公开了这个方法。产生双特异性抗体的进一步细节,参见,例如, Suresh 等, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)。

[0111] 根据在美国专利号 5,731,168 中描述的另一个方法,可以设计在抗体分子对之间的界面来最大化从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比。优选的界面至少包含 CH3 结构域的一部分。在这个方法中,来自第一抗体分子的界面的一个或多个小的氨基酸侧链被更大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换。在第二抗体分子的界面上产生与所述大的侧链相同或类似大小的补偿“腔”,这是通过用更小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链进行的。这提供了一种用于相对其它不需要的终产物诸如同型二聚体增加异二聚体的产量的机制。

[0112] 双特异性抗体包括交联或“异缀合物(heteroconjugate)”抗体。例如,在异缀合物中的所述抗体中的一个可以与抗生物素蛋白偶联,另一个与生物素偶联。例如,此类抗体已经被计划用来将免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利号 4,676,980),和用来治疗 HIV 感染(W091/00360、W092/200373 和 EP03089)。可应用任何常规的交联方法来制备异缀合物抗体。合适的交联剂和许多交联技术是本领域公知的,并公开在美国专利号 4,676,980 中。

[0113] 已经在文献中描述了从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,可以利用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan 等, *Science* 229:81 (1985) 描述了一种方法,其中完整的抗体被蛋白水解产生 $F(ab')_2$ 片段。在存在稳定邻位二硫醇和阻止分子间二硫化物形成的双硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下,还原这些片段。然后将产生的 Fab' 片段转变成硫代硝基苯甲酸酯(thionitrobenzoate) (TNB) 衍生物。然后通过巯基乙胺还原,将 Fab'-TNB 衍生物之一再转变成 Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另外的 Fab'-TNB 衍生物混合,从而形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可被用于酶的选择性固定化的物质。

[0114] 最近的进展促进了直接从大肠杆菌(*E. coli*)中回收 Fab'-SH 片段,其可被化学偶联来形成双特异性抗体。Shalaby 等, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) 描述了完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的生产。每个 Fab' 片段分别地从大肠杆菌分泌,在体外进行直接的化学偶联以形成双特异性抗体。这样形成的双特异性抗体能够与过量表达 ErbB2

受体的细胞和正常人 T 细胞结合,并且能触发人细胞毒淋巴细胞对人乳腺肿瘤靶点的细胞溶解活性。也已经描述了直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如,已经利用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny 等, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553(1992)。来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合被连接到两个不同抗体的 Fab' 部分。在绞链区还原抗体同二聚体以形成单体,然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这一方法还可用于产生抗体同二聚体。Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448(1993) 描述的“双抗体”技术提供了制造双特异性抗体片段的可选择机制。所述片段包括通过连接体与 VL 连接的 VH,所述连接体非常短从而不容许在相同链的两个结构域间配对。因此,一个片段的 VH 和 VL 结构域被强制与另一个片段的互补 VL 和 VH 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。已经报道了利用单链 Fv (sFv) 二聚体制造双特异性抗体片段的另一个策略。参见 Gruber 等, *J. Immunol.*, 152:5368(1994)。

[0115] 具有超过两个效价的抗体也在本发明的考虑范围内。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt 等, *J. Immunol.* 147:60(1991)。

[0116] 异缀合物抗体也在本发明的范围内。异缀合物抗体由两个共价连接的抗体组成。例如,此类抗体已经被提议用来将免疫系统细胞靶向不需要的细胞 [美国专利号 4,676,980],和用来治疗 HIV 感染 [W091/00360;W092/200373;EP03089]。预期可以在体外利用合成蛋白化学中已知的方法,包括那些涉及交联剂的方法来制备所述抗体。例如,可以利用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于这个目的的适合的试剂的实例包括亚氨基硫醇酯 / 盐和甲基 -4- 巯基丁亚氨酸酯,和例如在美国专利号 4,676,980 中公开的那些。

[0117] 多价抗体可比二价抗体更快地被表达该抗体与之结合的抗原的细胞纳入 (和 / 或分解代谢)。本发明的抗体可以是多价抗体 (其不为 IgM 类),具有三个或更多个抗原结合位点 (例如,四价抗体),其能够通过编码抗体多肽链的核酸的重组表达而容易地制得。多价抗体可包含二聚结构域以及三个或更多个抗原结合位点。优选的二聚结构域包括 (或由其组成) Fc 区或绞链区。在这一方案中,该抗体将包含 Fc 区和三个或更多个在 Fc 区氨基端的抗原结合位点。本文优选的多价抗体包含 (或由其组成) 三个至约八个、但优选四个抗原结合位点。多价抗体包含至少一条多肽链 (以及优选两条多肽链),其中所述多肽链包含两个或更多个可变域。例如,该多肽链可包含 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc,其中 VD1 是第一可变域,VD2 是第二可变域,Fc 是一条 Fc 区多肽链,X1 和 X2 表示氨基酸或多肽,并且 n 是 0 或 1。例如,该多肽链可包含:VH-CH1-柔性连接体-VH-CH1-Fc 区链、或 VH-CH1-VH-CH1-Fc 区链。本文的多价抗体优选还包含至少两个 (以及优选四个) 轻链可变域多肽。本文的多价抗体可以例如包含约两个至约八个轻链可变域多肽。本文所考虑的轻链可变域多肽包含轻链可变域以及任选地还包含 CL 结构域。

[0118] “特异性结合”特定多肽或特定多肽上的表位的抗体、或者对特定多肽或特定多肽上的表位“特异的”的抗体,是与该特定多肽或特定多肽上的表位结合而基本上不与任何其它多肽或多肽表位结合的抗体。

[0119] 术语“固相”描述了本发明的抗体可以附着在上面的非水的基质。本文包括的固相的实例包括部分地或全部由玻璃 (例如,可控孔度玻璃)、多糖 (例如,琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和硅酮 (silicones) 形成的那些固相。在某些实施方案中,取决

于具体情况,固相可以包括分析板的孔;在其它实施方案中,其是纯化柱(例如,亲和色谱柱)。这个术语还包括离散微粒的不连续固相,例如在美国专利号 4,275,149 中描述的那些。

[0120] “物种依赖性抗体(species-dependent antibody)”,例如哺乳动物抗人 IgE 抗体,是与对来自第二哺乳动物物种的该抗原的同系物相比,对来自第一哺乳动物物种的抗原具有更强的结合亲和性的抗体。通常,物种依赖性抗体“特异性地结合”人抗原(即,具有不超过约 1×10^{-7} M、或者不超过约 1×10^{-8} M、或者不超过约 1×10^{-9} M 的结合亲和性(Kd)值),但对来自第二种非人哺乳动物物种的该抗原的同系物的结合亲和性比其对所述非人抗原的结合亲和性弱至少约 50 倍、至少约 500 倍,或至少约 1000 倍。物种依赖性抗体可以是如上述定义的各种类型的抗体中的任何一种,但优选是人源化或人抗体。

[0121] 抗体“效应子作用”是指归因于抗体的 Fc 区(天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区)并随抗体同种型变化的那些生物学活性。抗体效应子作用的实例包括:Clq 结合和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)的下调;和 B 细胞活化。

[0122] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或 ADCC 是指细胞毒性的形式,其中与某些细胞毒细胞(例如自然杀伤(NK)细胞,嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的 Fc 受体(FcR)结合的分泌的 Ig 使得这些细胞毒效应细胞与拥有抗原的靶细胞特异性结合,并随后用细胞毒素杀死靶细胞。该抗体“武装”细胞毒细胞,并且是通过这一制剂杀死靶细胞所需要的。介导 ADCC 作用的主要细胞 NK 细胞仅表达 Fc γ RIII,而单核细胞则表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。关于造血细胞上 Fc 表达的总结见 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991) 的 464 页上的表 3。为了评价目的分子的 ADCC 活性,可进行体外 ADCC 测试法,诸如美国专利号 5,500,362 或 5,821,337 中所述的 ADCC 测试法。对于这类测试法的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。备选地或另外地,可在体内,例如在 Clynes 等, *PNAS USA* 95:652-656(1998) 所述的动物模型中,评估目的分子的 ADCC 活性。

[0123] “Fc 受体”或“FcR”描述与抗体的 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。而且,优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR(γ 受体),包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体(包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接型),Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA(“活化受体”)和 Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有主要区别在于其细胞浆结构域的相似的氨基酸序列。活化受体 Fc γ RIIA 在其细胞浆结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其细胞浆结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(参见 M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997)。FcR 的综述见 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991);Capel 等, *Immunomethods* 4:25-34(1994);以及 de Haas 等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)。本文中术语“FcR”涵盖其它 FcR,包括那些在将来将被鉴定的 FcR。该术语还包括负责将母体 IgG 转移到胎儿的新生儿受体 FcRn。Guyer 等, *J. Immunol.* 117:587(1976) 和 Kim 等, *J. Immunol.* 24:249(1994)。

[0124] “人类效应细胞”是表达一或多种 FcR 并执行效应子作用的白细胞。优选地,所述细胞表达至少 Fc γ RIII 并执行 ADCC 效应子作用。介导 ADCC 的人类白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞,单核细胞、细胞毒 T 细胞和嗜中性粒细胞;优选

PBMC 和 MNK 细胞。所述效应细胞可从其天然来源中分离,例如从血液中分离。

[0125] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体的存在下靶细胞的溶胞。经典补体途径的活化是由补体系统的第一个组分(C1q)与结合它们的相应(cognate)抗原的(适当亚型)抗体的结合而起始的。为了评价补体活化作用,可进行 CDC 测试,如 Gazzano-Santoro 等, *J. Immunol. Methods* 202:163(1996) 所述的。

[0126] 当用于描述本文公开的各种多肽和抗体时,“分离的”是指已从其产生的环境的组分中鉴定、分离和/或收回的多肽或抗体。优选地,分离的多肽没有与来自其产生环境的所有其他组分相缔合(association)。其产生环境中的污染成分(诸如从重组转染细胞中产生的那些)是通常将干扰该多肽的诊断或治疗的物质,并可包括酶、激素和其它蛋白质或非-蛋白质溶质。在优选的实施方案中,多肽被纯化至:(1)用转杯式序列分析仪,足以获得 N-末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度,或者(2)使用考马斯蓝或优选银染色,达到在非-还原或还原条件下 SDS-PAGE 同质性的程度。然而,通常用至少一个纯化步骤来制备分离的多肽或抗体。

[0127] 编码本文的多肽和抗体的“分离的”核酸分子是鉴定的并从至少一种污染物核酸分子分离的核酸分子,所述核酸分子通常在其产生的环境中与污染物核酸分子缔合。优选的,所述分离的核酸不与其产生环境相关的所有组分缔合。编码本文多肽和抗体的分离的核酸分子处于与其在自然状态中被发现的形式或环境不同的形式。因此分离的核酸分子不同于天然存在于细胞中的编码本文多肽和抗体的核酸。

[0128] 术语“控制序列”是指在特定的宿主生物中表达可操作(operably)连接的编码序列所必需的 DNA 序列。例如,适合于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。

[0129] 当一种核酸与另一种核酸序列处于功能相关的位置时,该核酸与该另一种核酸是“可操作相连的”。例如,前序列或分泌前导序列(secretory leader)的 DNA 与多肽的 DNA 是可操作相连的,如果其表达为参与该多肽的分泌的前蛋白的话;启动子或增强子与编码序列可操作相连,如果其影响该序列的转录的话;或核糖体结合位点与编码序列可操作相连,如果其位置能促进翻译的话。通常“可操作相连”指被连接的 DNA 序列是相邻的,而且,在分泌前导序列的情况下,则是相邻的且处于阅读相。然而,增强子不必是相邻的。连接可通过在方便的限制性位点处联接(ligation)而实现。如果不存在这样的位点,可根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或连接体。

[0130] 本文使用的术语“附加表位(epitope tagged)”是指包含与“标记(tag)多肽”融合的本文描述的多肽或抗体的嵌合多肽。标记多肽具有足够的残基以提供针对其可以产生抗体的表位,而该标记多肽又足够短从而不干扰与其融合的多肽的活性。标记多肽优选还是十分独特的,以致所述抗体基本上不与其它表位交叉反应。适合的标记多肽一般具有至少六个氨基酸残基,通常约 8 至 50 个氨基酸残基(优选的,约 10 至 20 个氨基酸残基)。

[0131] 本文中使用的术语“免疫粘附素”是指抗体样分子,其组合了异源蛋白(“粘附素”)的结合特异性和免疫球蛋白恒定域的效应子作用。结构上,免疫粘附素包含具有所需结合特异性的氨基酸序列与免疫球蛋白恒定域序列的融合物,所述具有所需结合特异性的氨基酸序列不同于抗体的抗原识别和结合位点(即为“异源的(heterologous)”)。免疫粘附素分子的粘附素部分通常是至少包含受体或配体的结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素

中的免疫球蛋白恒定域序列可以得自任何免疫球蛋白,诸如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 亚型、IgA(包括 IgA-1 和 IgA-2)、IgE、IgD 或 IgM。Ig 融合物优选包括在 Ig 分子内的至少一个可变区的位置处用本文描述的多肽或抗体的结构域替代。在特别优选的实施方案中,免疫球蛋白融合物包括 IgG1 分子的铰链、CH2 和 CH3 区域;或铰链、CH1、CH2 和 CH3 区域。关于免疫球蛋白融合物的生产还参见 1995 年 6 月 27 日授权的美国专利号 5,428,130。

[0132] 术语“药物制剂”是指以允许活性成分的生物活性有效的形式存在的制剂,并且其不含对待施用该制剂的受试者具有不能接受的毒性的其他成分。

[0133] 如果抗体的生物活性在给定时间内为制备药物制剂时具有的生物活性的约 10% 以内(在测试法误差之内),则抗体在药物制剂中拥有“生物活性”,如通过抗体在体外或体内与抗原结合并导致可测量的生物学反应的能力所确定的那样。

[0134] “稳定的”制剂是这样的制剂,在贮存期间其中的蛋白质基本上保持它的物理和/或化学稳定性。可以在选定的温度测量选定时段的稳定性。优选地,制剂在室温($\sim 30^{\circ}\text{C}$)或 40°C 稳定至少 1 个月和/或在约 $2-8^{\circ}\text{C}$ 稳定至少 1 年,并且优选稳定至少 2 年。例如,在贮存期间的聚集度可以被用作蛋白质稳定性的指标。因而,“稳定的”制剂可以是这样的制剂,其中少于约 10% 并优选少于约 5% 的蛋白在该制剂中以聚集物存在。本领域现有各种测量蛋白质稳定性的分析技术,并且例如在 Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) 和 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993) 中有综述。

[0135] 术语“水性溶液”是指其中水是溶解介质或溶剂的溶液。当物质溶解于液体中时,该混合物称为溶液。被溶解的物质是溶质,而进行溶解的液体(该情况中为水)为溶剂。

[0136] 本文使用的术语“稳定剂”是这样的化学物质或化合物,即将其添加至溶液或混合物或混悬液或组合物或治疗组合物中,以使其保持处于稳定状态或不改变的状态;或之所以使用其是因为其产生导致更稳定或不改变的状态的涉及原子或分子的变化反应。

[0137] 能够降低含有蛋白质的水性制剂的粘度的化合物的“降低粘度量”是在加入其中后能可测量地降低制剂粘度的量。

[0138] “等渗的”制剂是基本上具有与人类血液相同的渗透压的制剂。等渗的制剂一般地具有约 250 至 350mOsm 的渗透压。术语“低渗的”描述渗透压低于人类血液渗透压的制剂。相应地,术语“高渗的”被用于描述渗透压高于人类血液渗透压的制剂。例如,可以利用蒸气压或冰冻型渗透压计来测量等渗性。

[0139] “重构的(reconstituted)”制剂是已经通过将冻干的蛋白或抗体制剂溶解在稀释剂中以使蛋白分散在该重构制剂中而制备的制剂。重构的制剂适合于向需要用目的蛋白治疗的患者施用(例如,肠胃外施用),在本发明的某些实施方案中,可以是适合于皮下施用的制剂。

[0140] “表面活性剂”是由于它们的化学组成而能够在固体-固体、固体-液体、液体-液体以及液体-空气的表面发挥它们的作用的表面活性物质,其含有亲水和疏水基团。这些物质降低了稀释溶液中空气-水和/或水-固体界面处的蛋白浓度,在所述界面处蛋白能够被吸附并可能聚集。表面活性剂可与蛋白制剂中的疏水界面结合。在水表面上的蛋白将聚集,尤其是当搅拌时,这是因为蛋白质单层的解折叠以及随后的聚集。

[0141] “表面活性剂”可变性蛋白质,但也可以使他们稳定,对抗表面变性作用。一般地,

离子表面活性剂可变性蛋白质。然而,非离子表面活性剂甚至在相对高浓度(1%w/v)也不会变性蛋白质。多数亲本(parentally)可接受的非离子表面活性剂来自聚山梨酯或聚醚组。聚山梨酯 20 和 80 是市售蛋白制剂中的当代的表面活性剂稳定剂。然而,在蛋白制剂中使用的其他表面活性剂包括 Pluronic F-68 和“Brij”类的成员。非离子表面活性剂可以是基于糖的。基于糖的表面活性剂可以是烷基糖苷类。烷基糖苷的一般结构为 $R_1-O-(CH_2)_x-R$, 其中 R 独立地为 CH_3 或环己基(C_6H_{11})且 R_1 独立地为葡萄糖或麦芽糖。示例性的烷基糖苷包括以下这些,其中: R_1 为葡萄糖,R 为 CH_3 ,并且 x 是 5(正己基- β -D-吡喃葡萄糖苷),x 为 6(正庚基- β -D-吡喃葡萄糖苷),x 为 7(正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷),x 为 8(正壬基- β -D-吡喃葡萄糖苷),x 为 9(正癸基- β -D-吡喃葡萄糖苷),以及 x 为 11(正十二基- β -D-吡喃葡萄糖苷)。有时吡喃葡萄糖苷也称为葡萄糖苷。示例性的烷基糖苷还包括以下这些,其中: R_1 是麦芽糖,R 为 CH_3 ,且 x 是 5(正己基- β -D-吡喃麦芽糖苷),x 为 7(正辛基- β -D-吡喃麦芽糖苷),x 为 8(正壬基- β -D-吡喃麦芽糖苷),x 为 9(正癸基- β -D-吡喃麦芽糖苷),x 为 10(正十一基- β -D-吡喃麦芽糖苷),x 为 11(正十二基- β -D-吡喃麦芽糖苷),x 为 12(正十三基- β -D-吡喃麦芽糖苷),x 为 13(正十四基- β -D-吡喃麦芽糖苷),以及 x 为 15(正十六基- β -D-吡喃麦芽糖苷)。有时吡喃麦芽糖苷也称为麦芽糖苷。示例性的烷基糖苷还包括以下这些,其中: R_1 是葡萄糖,x 为 3,且 R 是环己基(3-环己基-1-丙基- β -D-葡萄糖苷);以及其中 R_1 是麦芽糖,x 为 4,且 R 是环己基(4-环己基-1-丁基- β -D-麦芽糖苷)。

[0142] “可药用酸”包括无机酸和有机酸,在它们被配制的浓度和方式下是无毒的。例如,适合的无机酸包括盐酸、高氯酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、硫酸、磺酸、亚磺酸、磺胺酸、磷酸、碳酸等等。适合的有机酸包括直链和支链的烷基、芳族的、环状的、环脂肪族的、芳基脂肪族的、杂环的、饱和的、不饱和的、单羧酸、二羧酸和三羧酸,包括例如甲酸、乙酸、2-羟基乙酸、三氟乙酸、苯乙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、邻氨基苯甲酸、丙酸、2-羟基丙酸、2-氧代丙酸、丙二酸、环戊烷丙酸、环戊烷丙酸、3-苯基丙酸、丁酸、丁二酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、2-乙酰氧基-苯甲酸、抗坏血酸、肉桂酸、十二烷基硫酸、硬脂酸、粘康酸、扁桃酸、琥珀酸、扑酸(embonic acid)、富马酸、苹果酸、马来酸、羟基马来酸、丙二酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、乙醇酸、葡糖酸(glyconic acid)、葡糖酸(gluconic acid)、丙酮酸、乙醛酸、草酸、甲磺酸、琥珀酸、水杨酸、邻苯二甲酸、palmoic acid、palmeic acid、硫氰酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、萘-2-磺酸、对甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基二环[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸、葡庚糖酸、4,4'-亚甲基双-3-(羟基-2-烯-1-甲酸)、羟基萘甲酸。

[0143] “可药用碱”包括无机碱和有机碱,在它们被配制的浓度和方式下是无毒的。例如,适合的碱包括由形成无机碱的金属例如锂、钠、钾、镁、钙、铵、铁、锌、铜、锰、铝形成的那些碱,N-甲基葡糖胺,吗啉,哌啶,和有机无毒碱,包括伯胺、仲胺和叔胺、取代的胺、环胺和碱离子交换树脂[例如, $N(R')_4+$ (其中 R' 独立地是 H 或 C_{1-4} 烷基,例如,铵、Tris)],例如,异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二乙基氨基乙醇、氨基丁三醇(trimethamine)、二环己基胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、嘌呤、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。特别优选的有机无毒碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、氨基丁三醇、二环

己基胺、胆碱和咖啡因。

[0144] 本发明可用的其他的可药用酸和碱包括那些来源于氨基酸的酸和碱,所述氨基酸例如组氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸和天冬酰胺。

[0145] “可药用的”缓冲剂和盐包括来源于上述指明的酸和碱加成盐的那些缓冲剂和盐。具体的缓冲剂和 / 或盐包括组氨酸、琥珀酸盐和乙酸盐。

[0146] “冻干保护剂 (lyoprotectant)”是这样的分子,当其与目的蛋白质组合时,其在冻干和随后的贮存中显著地防止或减少蛋白质的物理化学不稳定性。示例性的冻干保护剂包括糖和它们相应的糖醇;氨基酸,诸如谷氨酸单钠或组氨酸;甲胺,诸如甜菜碱;易溶盐,诸如硫酸镁;多元醇,诸如三元的或较高分子量的糖醇,例如甘油 (glycerin)、葡聚糖、赤藓醇、丙三醇 (glycerol)、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨醇和甘露醇;丙二醇;聚乙二醇; **Pluronic®**;及其组合。其他的示例性冻干保护剂包括甘油和明胶,以及糖类蜜二糖 (mellibiose)、松三糖、棉子糖、甘露三糖和水苏糖。还原糖的实例包括葡萄糖、麦芽糖、乳糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖和乳果糖。非还原糖的实例包括非还原的多羟基化合物的糖苷,所述多羟基化合物选自糖醇及其它直链多元醇。优选的糖醇是单糖苷,特别是通过将二糖诸如乳糖、麦芽糖、乳果糖和麦芽酮糖还原而获得的那些化合物。配糖 (glycosidic) 侧基可以是葡糖苷的 (glucosidic) 或半乳糖苷的 (galactosidic)。糖醇的其他的实例是葡糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇和异麦芽酮糖。优选的冻干保护剂是非还原糖海藻糖或蔗糖。

[0147] 将冻干保护剂以“冻干保护量”添加到冻干前的制剂中,这意味着,在存在冻干保护量的冻干保护剂的情况下对蛋白质冻干之后,在冻干和贮存期间蛋白质基本上保持它的物理化学稳定性。

[0148] “可药用糖”是当其与目的蛋白质组合时,在贮存期间显著地防止或减少蛋白质的物理化学不稳定性的分子。当制剂将要被冻干然后被重构时,“可药用糖”也可称为“冻干保护剂”。示例性的糖和它们相应的糖醇包括:氨基酸,诸如谷氨酸单钠或组氨酸;甲胺,例如甜菜碱;易溶盐,例如硫酸镁;多元醇,例如三元的或较高分子量的糖醇,例如甘油 (glycerin)、葡聚糖、赤藓醇、丙三醇 (glycerol)、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨醇和甘露醇;丙二醇;聚乙二醇; **Pluronic®**;及其组合。其他的示例性冻干保护剂包括甘油和明胶,以及糖类蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖和水苏糖。还原糖的实例包括葡萄糖、麦芽糖、乳糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖和乳果糖。非还原糖的实例包括非还原的多羟基化合物的糖苷,所述多羟基化合物选自糖醇及其它直链多元醇。优选的糖醇是单糖苷,特别时通过将二糖例如乳糖、麦芽糖、乳果糖和麦芽酮糖还原而获得的那些化合物。配糖 (glycosidic) 侧基可以是葡糖苷的 (glucosidic) 或半乳糖苷的 (galactosidic)。糖醇的其他的实例是葡糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇和异麦芽酮糖。优选的可药用糖是非还原糖海藻糖或蔗糖。

[0149] 以“保护量”将可药用糖添加到制剂中 (例如,冻干前),这意味着在贮存期间 (例如,在重构和贮存之后) 蛋白质基本上保持它的物理化学稳定性。

[0150] 本文感兴趣的“稀释剂”是可药用的 (对于向人类施用是安全的和无毒的)、可用于配制液体制剂的稀释剂,所述液体制剂诸如是在冻干之后重构的制剂。示例性的稀释剂包括无菌水、抑菌注射用水 (BWF1)、pH 缓冲溶液 (例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、Ringer's 溶液或葡萄糖溶液。在备选的实施方式中,稀释剂可以包括盐和 / 或缓冲剂的水溶液。

[0151] “防腐剂”是可被添加到本文制剂中以降低细菌活性的化合物。添加防腐剂可以，例如便于生产多次使用（多剂量）的制剂。可能的防腐剂的实例包括十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲氯铵、苯扎氯铵（烷基苄基二甲基氯化铵的混合物，其中烷基基团是长链化合物）和苄索氯铵。其它类型的防腐剂包括芳香醇类，诸如苯酚、丁基和苄基醇、烷基对羟苯甲酸酯，诸如甲基或丙基对羟苯甲酸酯、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇、和 m-甲酚。本文最优选的防腐剂是苄醇。

[0152] “治疗”是指治疗处理以及预防性或防范性措施。需要治疗的对象包括已经患有疾病以及需要预防疾病的那些对象。

[0153] 用于治疗目的的“哺乳动物”是指被分类为哺乳动物的任何动物，包括人类、家养动物和农场动物、和动物园、体育或宠物动物，诸如狗、马、兔、牛、猪、仓鼠、沙鼠、小鼠、雪貂、大鼠、猫等等。优选的，哺乳动物是人。

[0154] “疾病”是将从所述蛋白质治疗中受益于任何情况。这包括慢性的和急性的疾病或病症，包括使得哺乳动物易患所谈论的疾病的那些病理学情况。文中待被治疗的疾病的非限制性实例包括癌和炎症。

[0155] “治疗有效量”至少是对于特定的疾病引起可测量的改善或预防所需的最小浓度。已知蛋白的治疗有效量是本领域公知的，在下文中揭示的蛋白质的有效量可以通过技术人员例如普通医师的能力范围内的标准技术来确定。

[0156] 本文使用的“粘度”可以是“绝对粘度 (absolute viscosity)”或“运动粘度 (kinematic viscosity)”。“绝对粘度”有时也称为动态或简单粘度，是描述流体流动的阻力的量。“运动粘度”是绝对粘度和流体密度的商。当应用毛细管粘度计来表征流体的抵抗流动 (resistive flow) 时，通常报道运动粘度。当将两种等体积的流体置于相同的毛细管粘度计并允许在重力作用下流动时，粘性流体比较低粘性流体花费更长的时间流过该毛细管。如果一种流体花费 200 秒完成其流动，而另一种流体花费 400 秒，在运动粘度的尺度上第二种流体的粘度是第一种的两倍。如果两种流体具有相等的密度，则在绝对粘度尺度上第二种流体的粘度是第一种的两倍。运动粘度的量纲是 L^2/T ，其中 L 表示长度，T 表示时间。运动粘度的 SI 单位是 m^2/s 。通常，运动粘度用厘沱 (cSt) 表示，其等于 mm^2/s 。绝对粘度的量纲是 $M/L/T$ ，其中 M 表示质量，L 和 T 分别表示长度和时间。绝对粘度的 SI 单位是 $Pa \cdot s$ ，其等于 $kg/m \cdot s$ 。绝对粘度通常用厘泊 (cP) 为单位表示，厘泊等于毫帕·秒 ($mPa \cdot s$)。

[0157] 制备可如本文描述的那样配制的抗体（包括与毒素缀合的抗体）及其他蛋白质的方法是本领域公知的，并且例如详述于 W02007/001851。

[0158] 抗体和其他蛋白质可根据本发明配制为水性 (aqueous) 形式或冻干形式，如果能重构为水性形式，后者是可能的。

[0159] 本文描述的制剂可以被制备为重构的冻干制剂。冻干本文描述的蛋白质或抗体，然后重构以产生本发明的液体制剂。在这一特定的实施方案中，在如上所述制备感兴趣的蛋白质之后，产生“冻干前 (pre-lyophilized) 制剂”。存在于所述冻干前制剂中的蛋白的量考虑到期望的剂量体积、施用的方式等来确定。例如，完整抗体的起始浓度可以为约 2mg/ml 至约 50mg/ml，优选约 5mg/ml 至约 40mg/ml 以及最优选约 20-30mg/ml。

[0160] 待配制的蛋白一般存在于溶液中。例如，在本发明的液体制剂中，蛋白可以存在于 pH 值约 4-8、优选约 5-7 的 pH 缓冲溶液中。取决于，例如，缓冲液和期望的制剂张力（例如

重构的制剂的张力),缓冲液浓度可以为约 1mM 至约 200mM,备选地约 1mM 至约 100mM,备选地约 1mM 至约 50mM。示例性的缓冲剂和 / 或盐是可药用的、并可以从适合的酸、碱和它们的盐产生的那些缓冲剂或盐,诸如在“可药用”酸、碱或缓冲剂下定义的那些。

[0161] 在一个实施方案中,向冻干前制剂中添加冻干保护剂。在冻干前制剂中冻干保护剂的量一般要使得一旦重构产生的制剂是等渗的。然而,高渗的重构制剂也可能是适合的。此外,冻干保护剂的量不能太低,以致在冻干时发生无法接受量的蛋白质降解 / 聚集。然而,在冻干前制剂中示例性的冻干保护剂浓度是约 10mM 至约 400mM,备选地约 30mM 至约 300mM,备选地约 50mM 至约 100mM。示例性的冻干保护剂包括糖和糖醇,诸如蔗糖、甘露糖、海藻糖、葡萄糖、山梨醇、甘露醇。然而,在特定的环境下,某些冻干保护剂也可增加制剂的粘度。如此,应当小心地选择能最小化和中和该影响的特定的冻干保护剂。在“冻干保护剂”的定义下的上述额外的冻干保护剂在本文中也称为“可药用糖”。

[0162] 对于每一特定的蛋白质或抗体与冻干保护剂的组合,蛋白质与冻干保护剂的比例可以变化。对于抗体作为选取的蛋白以及糖(例如,蔗糖或海藻糖)作为冻干保护剂用来产生高蛋白浓度的等渗重构制剂的情况,冻干保护剂与抗体的摩尔比例可以是约 100 至约 1500 摩尔冻干保护剂比 1 摩尔抗体,以及优选地约 200 至约 1000 摩尔冻干保护剂比 1 摩尔抗体,例如约 200 至约 600 摩尔冻干保护剂比 1 摩尔抗体。

[0163] 可以在所述冻干前制剂的制备中使用冻干保护剂(例如蔗糖或海藻糖)和填充剂(例如甘露醇或甘氨酸)的混合物。填充剂可以容许产生没有过多孔穴在其中的均匀的冻干块。其它可药用载体、赋形剂或稳定剂,诸如在 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版,Osol, A. Ed. (1980) 中描述的那些,可以被包括在冻干前制剂(和 / 或冻干制剂和 / 或重构制剂)中,只要它们不会对制剂的期望特性有不利的影 响。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在应用的剂量和浓度下对于接受者是无毒的,包括:其他的缓冲剂;防腐剂;共溶剂;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;螯合剂,诸如 EDTA;金属复合物(例如 Zn-蛋白质复合物);可生物降解的聚合物,诸如聚酯;和 / 或成盐抗衡离子,诸如钠。

[0164] 本文的制剂也可包含超过一种的为被治疗的特定适应征所必需的蛋白质,优选具有不对其他蛋白质造成不利影响的互补活性的那些。例如,在单个制剂中提供与期望的靶点(例如,受体或抗原)结合的两种或更多种抗体可能是需要的。此类蛋白质以对预定目标有效的量适当地组合存在。

[0165] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。在冻干和重构之前,或在之后,这可以用无菌过滤膜来过滤来很容易地实现。备选地,可以通过对除蛋白以外的成分,在约 120°C 高压灭菌例如约 30 分钟来实现整个混合物的无菌化。

[0166] 在蛋白、任选的冻干保护剂及其它任选组分混合在一起之后,将制剂冻干。为此,许多不同的冷冻干燥器是可用的,例如 Hu1150™(Hu11, USA) 或 GT20™(Leybold-Heraeus, Germany) 冷冻干燥器。通过冷冻制剂,随后在适合于初级干燥的温度下从冷冻的内容物中升华冰来实现冻干。在这一情况中,产品温度低于制剂的低共熔点或坍塌温度(collapse temperature)。一般地,用于初级干燥的搁板温度(shelf temperature)范围为约 -30°C 至 25°C(前提是初级干燥期间产物保持冷冻),处于适当的压力下,范围一般为约 50 至 250mTorr。制剂、容纳样品的容器的大小和类型(例如,玻璃小瓶)和液体的体积将主要决定干燥所需的时间,其可以在几小时到几天(例如,40-60 小时)的范围内变动。任选地,取

决于产品中期望的残留水分水平,也可以进行次级干燥 (secondary drying)。进行次级干燥的温度范围为约 0-40℃,主要取决于容器的类型和大小以及使用的蛋白的种类。例如,在冻干的整个除水阶段中搁板温度可以是约 15-30℃ (例如,约 20℃)。次级干燥所需的时间和压力是能产生适合的冻干块的时间和压力,取决于,例如温度及其它参数。次级干燥时间由在产物中期望的残留水分水平来决定,典型地需要至少约 5 小时 (例如,10-15 小时)。压力可以是与初级干燥步骤期间使用的相同的。取决于制剂和小瓶的大小,冻干条件可以变化。

[0167] 在向患者施用之前,用可药用稀释剂重构冻干制剂,从而使在重构制剂中的蛋白浓度为至少约 50mg/ml,例如约 50mg/ml 至约 400mg/ml,备选地约 80mg/ml 至约 300mg/ml,备选地约 90mg/ml 到约 150mg/ml。当希望在皮下递送重构制剂时,在重构制剂中的这种高蛋白浓度被认为是特别有用的。然而,对于其它施用途径,诸如静脉内施用,重构制剂中较低的蛋白浓度可能是所期望的 (例如,在重构制剂中的蛋白为约 5-50mg/ml,或约 10-40mg/ml)。在某些实施方案中,重构制剂中的蛋白浓度比冻干前制剂中的浓度显著更高。例如,重构制剂中的蛋白浓度可以是冻干前制剂中的蛋白浓度的约 2-40 倍、或 3-10 倍、或 3-6 倍 (例如至少三倍或至少四倍)。

[0168] 尽管若需要的话也可以使用其它温度,但一般地在约 25℃ 进行重构以确保完全水化。重构所需的时间取决于,例如,稀释剂的类型、赋形剂的量和蛋白质。示例性的稀释剂包括无菌水、抑菌注射用水 (BWF)、pH 缓冲溶液 (例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、Ringer 溶液或葡萄糖溶液。稀释剂任选地含有防腐剂。示例性的防腐剂已经在上文中描述了,其中芳香醇类诸如苯醇或酚醇是优选的防腐剂。使用的防腐剂的量通过就对蛋白的相容性和防腐效率试验评定不同的防腐剂浓度来确定。例如,如果防腐剂是芳香醇类 (诸如苯醇),其可以以约 0.1-2.0% 以及优选约 0.5-1.5%、但最优选约 1.0-1.2% 的量存在。

[0169] 优选地,重构制剂每小瓶含有少于 6000 个粒子大小 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的粒子。

[0170] 通过将具有期望的纯度的活性成分与任选的可药用载体、赋形剂或稳定剂混合,制备用于贮存的治疗制剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences 第 18 版, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042[1990])。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,包括缓冲剂,抗氧化剂,包括抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素 E、偏亚硫酸氢钠,防腐剂,等渗剂,稳定剂,金属复合物 (例如 Zn 蛋白质复合物),和 / 或螯合剂诸如 EDTA。

[0171] 当治疗剂是抗体片段时,特异地与目标蛋白的结合结构域结合的最小片段是优选的。例如,根据抗体的可变区序列,可以设计抗体片段或甚至肽分子,其保留与目标蛋白序列结合的能力。这类肽可以化学合成和 / 或通过 DNA 重组技术生产 (参见,例如, Marasco 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:7889-7893[1993])。

[0172] 使用缓冲剂来将 pH 值控制在能使疗效最优化的范围内,特别是当稳定性依赖于 pH 值时。缓冲剂优选以约 1mM 至约 200mM、备选地约 1mM 至约 100mM、备选地约 1mM 至约 50mM、备选地约 3mM 至约 15mM 的浓度存在。本发明使用的适合的缓冲剂包括有机的和无机的酸,和它们的盐。例如,柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。另外,缓冲剂可以由下面物质组成:组氨酸和三甲胺盐,例如 Tris。

[0173] 添加防腐剂以延缓微生物生长,防腐剂一般以 0.2%-1.0%(w/v) 存在。本发明使用

的适合的防腐剂包括：十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲氯铵；苄甲烷铵 (benzalkonium) 卤化物（例如氯化物、溴化物、碘化物），苄索氯铵；硫柳汞，苯酚，丁基或苄基醇；烷基对羟苯甲酸酯，诸如甲基对羟苯甲酸酯或丙基对羟苯甲酸酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇，3-戊醇，和 m-甲酚。

[0174] 张力剂 (tonicity agent)，有时被称为“稳定剂”，其用来调整或维持液体组合物的张力。当与大的、带电生物分子诸如蛋白和抗体一起使用时，它们通常称为“稳定剂”，因为它们能与氨基酸侧链的带电基团相互作用，从而减少分子间和分子内相互作用的可能性。考虑其它成分的相对量，张力剂可以以 0.1% 至 25% 重量、优选 1 至 5% 间的任何量存在。优选的张力剂包括多羟基糖醇，优选三羟基或更高的糖醇，诸如甘油、赤藓醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨醇和甘露醇。

[0175] 其他的赋形剂包括可以充当下列的一种或多种的物质：(1) 填充剂，(2) 增溶剂，(3) 稳定剂和 (4) 防止变性或对容器壁的附着的物质。此类赋形剂包括：多羟基糖醇（在上文中列举的）；氨基酸，诸如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等等；有机糖或糖醇，诸如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、myoinisitolose、myoinisitol、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环多醇（例如，肌醇）、聚乙二醇；含硫还原剂，诸如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠；低分子量蛋白，诸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其它免疫球蛋白；亲水聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；单糖（例如，木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖）；二糖（例如，乳糖、麦芽糖、蔗糖）；三糖，诸如棉子糖；和多糖诸如糊精或葡聚糖。

[0176] 为了将制剂用于体内施用，它们必须是无菌的。可以用无菌滤膜过滤来使制剂无菌化。本文的治疗组合物一般被放入到具有无菌进出口的容器中，例如，静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶。

[0177] 施用途径是按照已知的和公认的方法，诸如一次或多次推注 (bolus) 或以合适的方式在一段长时间内输注，例如，通过皮下、静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、病灶内或关节内途径注射或输注，局部施用，吸入或通过持续释放或延时释放方式。

[0178] 本文的制剂还可包含为被治疗的特定适应征所需要的超过一种的活性化合物，优选不会相互带来不利影响的具有互补活性的那些活性化合物。备选地或此外，所述组合物可包含细胞毒性剂、细胞因子或生长抑制剂。此类分子以对预定目的有效的量适当地、组合存在。

[0179] 也可以将活性成分包裹在微囊、胶体药物递送系统（例如，脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米粒子和纳米囊）或粗乳液 (macroemulsions) 中，所述微囊通过例如凝聚技术或界面聚合作用来制备，分别例如羟甲基纤维素或明胶微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊。这些技术公开在 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 18 版中，同上。

[0180] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合的实例包括，含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质，所述基质为有形物的形式，例如薄膜，或微囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶（例如，聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)，或聚(乙烯醇))、聚交酯（美国专利号 3,773,919）、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物，诸如 LUPRON DEPOT™（由乳酸-羟基

乙酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。已经用人生长激素(rhGH)、干扰素-(rhIFN-)、白细胞介素-2和MN rpg120成功地进行了用于持续释放的重组蛋白的微囊化。Johnson等人, Nat. Med. 2:795-799(1996);Yasuda等人, Biomed. Ther. 27:1221-1223(1993);Hora等人, Bio/Technology8:755-758(1990);Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; W097/03692; W096/40072; W096/07399; 以及美国专利号 5,654,010。

[0181] 这些蛋白的持续释放制剂可以利用聚乳酸-共羟基乙酸(PLGA)聚合物来开发,因为PLGA具有生物相容性和广泛的生物可降解性质。PLGA的降解产物(乳酸和羟基乙酸)可以很快地从人体中清除。此外,取决于其分子量和组成,这一聚合物的降解性可以从数月数年到数年间调整。Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", 在 Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker; New York, 1990), M. Chasin 和 R. Langer (编辑) pp. 1-41。

[0182] 聚合物诸如乙烯醋酸乙烯酯和乳酸-羟基乙酸使得能够在超过100天的时间释放分子,某些水凝胶在较短的时期内释放蛋白。当封装的抗体在体内保持很长时间时,由于在37°C暴露于的湿气,它们可能变性或聚集,导致生物学活性的丧失和可能的免疫原性的变化。取决于所涉及的机制,为了稳定化可以设计出合理的策略。例如,如果发现聚集机制是通过硫代-二硫化物互换的分子间S-S键形成,则可以通过修饰巯基残基、从酸性溶液中冻干、控制含水量、利用适当的添加剂、和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0183] 脂质体或类蛋白组合物也可被用于配制本文公开的蛋白或抗体。参见美国专利号 4,925,673 和 5,013,556。

[0184] 本文描述的蛋白和抗体的稳定性可以通过使用无毒的“水溶性多价金属盐”来增强。实例包括 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Sn^{4+} 、 Al^{2+} 和 Al^{3+} 。可以与上述多价金属阳离子形成水溶性盐的阴离子的实例包括由无机酸和/或有机酸形成的那些阴离子。此类水溶盐在水中的溶解度(20°C)是至少约20mg/ml,或至少约100mg/ml,或至少约200mg/ml。

[0185] 可用于形成所述“水溶性多价金属盐”的适合的无机酸包括盐酸、硫酸、硝酸、硫氰酸和磷酸。可以使用的适合的有机酸包括脂肪族羧酸和芳香酸。在这个定义下的脂肪族羧酸可被定义为饱和的或不饱和的 C_{2-9} 羧酸(例如,脂肪族的单、二和三羧酸)。例如,在这个定义中的示例性单羧酸包括饱和的 C_{2-9} 单羧酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸和 capryonic 酸,和不饱和的 C_{2-9} 单羧酸,丙烯酸、丙炔酸(propargylic acid)、甲基丙烯酸、巴豆酸和异巴豆酸。示例性二羧酸包括饱和的 C_{2-9} 二羧酸,丙二酸、琥珀酸、戊二酸、己二酸和庚二酸,而不饱和 C_{2-9} 二羧酸包括马来酸、富马酸、柠康酸和甲基延胡索酸。示例性的三羧酸包括饱和的 C_{2-9} 三羧酸,丙三羧酸和1,2,3-丁烷三羧酸。另外,该定义的羧酸还可包含一个或两个羟基形成羟基羧酸。示例性的羟基羧酸类包括羟基乙酸、乳酸、甘油酸、羟基丙二酸、苹果酸、酒石酸和柠檬酸。这个定义中的芳香酸包括苯甲酸和水杨酸。

[0186] 通常使用的能用来帮助稳定本发明的封装的多肽的水溶性多价金属盐包括,例如:(1)卤化物的无机酸金属盐(例如,氯化锌、氯化钙)、无机酸金属的硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐和硫氰酸盐;(2)脂肪族羧酸金属盐(例如,乙酸钙、乙酸锌、丙酸钙(calcium

propionate)、羟基乙酸锌、乳酸钙、乳酸锌和酒石酸锌);和(3)芳香族羧酸金属盐,苯甲酸盐(例如,苯甲酸锌)和水杨酸盐。

[0187] 为了预防或治疗疾病,活性剂的合适剂量将取决于需治疗的如上文定义的疾病类型、疾病的严重度和进程、施用活性剂是为了预防目的还是治疗目的、先前的治疗、患者的病史和对活性剂的反应,以及主治医师的判断。一次性或在一系列治疗中将活性剂适当地施用给患者。

[0188] 可以将本发明的方法与已知的治疗疾病的方法组合,既可以作为组合的或附加的治疗步骤,也可以作为治疗制剂的额外组分。

[0189] 本发明药物组合物的剂量和期望的药物浓度可取决于预想的特定用途而变化。确定合适剂量或给药途径完全在普通技术人员的能力范围内。动物试验为确定用于人类治疗的有效剂量提供了可靠的指导。可以根据 Mordenti, J. 和 Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi 等编辑, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-46 中提出的原则进行有效剂量的种间换算。

[0190] 当进行本文描述的多肽或抗体的体内施用时,正常的剂量数取决于施用途径可以从每天约 10ng/kg 直至约 100mg/kg 哺乳动物体重或更多,优选约 1mg/kg/天到 10mg/kg/天。已经在文献中提供了对递送的特别剂量和方法的指导,参见,例如美国专利号 4,657,760、5,206,344 或 5,225,212。包含在本发明的范围之内的是,不同的制剂对于不同的治疗和不同的疾病是有效的,以及意图治疗特定器官或组织的施用可能需要以不同于治疗另一器官或组织的方式来递送。此外,剂量可以通过一次或多次独立的施用,或通过连续的输注来施用。对于持续几天或更长时间的重复施用,取决于情况,持续进行治疗直到产生期望的对疾病症状的抑制。然而,其它剂量方案也是有用的。可以通过常规的技术和测量来容易地监测治疗的进展。

[0191] 根据已知的方法将本发明的制剂包括但不限于重构制剂施用至需要用所述蛋白治疗的哺乳动物优选人,所述已知方法例如以推注(bolus)或在一段时间内的连续输注的静脉施用、通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑液内、鞘膜内、口服、局部或吸入途径。

[0192] 在优选的实施方案中,通过皮下施用(即,在皮肤之下)将所述制剂施予哺乳动物。为此,可以利用注射器注射所述制剂。然而,用于施用所述制剂的其它装置是可用的,诸如注射装置(例如,Inject-ease™ 和 Genject™ 装置);注射笔(诸如 GenPen™);自动注射装置、无针的装置(例如,MediJector™ 和 BioJector™)和皮下贴剂递送系统。

[0193] 在一特定的实施方案中,本发明涉及用于单剂量施用单位的试剂盒。这种试剂盒包含治疗蛋白或抗体的水性制剂的容器,包含单腔的或多腔的预填充注射器。示例性的预填充注射器可从 Vetter GmbH, Ravensburg, Germany 获得。

[0194] 蛋白质的合适剂量("治疗有效量")将取决于,例如,需治疗病患、病患的严重度和进程、施用蛋白是为了预防目的还是治疗目的、先前的治疗、患者的病史和对蛋白的反应,使用的蛋白种类、和主治医师的判断。一次性或在一系列治疗中向患者适当地施用蛋白,也可自诊断后任何时候向患者施用。所述蛋白可以作为唯一的治疗来施用,或与可用于治疗所讨论病患的其它药物或治疗方法组合施用。

[0195] 当所选择的蛋白是抗体时,约 0.1-20mg/kg 是施用至患者的最初候选剂量,例如,不论是一次施用还是多次独立施用。然而,其它剂量方案可能是有用的。可以通过常规技术来容易地监测治疗的进展。

[0196] 在本发明的另一个实施方案中,提供包含所述制剂的制品,并且优选提供它的使用说明。所述制品包含容器。适合的容器包括,例如,瓶子、小瓶(例如,双腔小瓶)、注射器(例如,单腔或双腔注射器)和试管。所述容器可以由各种材料诸如玻璃或塑料制成。位于装有所述制剂的容器上的或与之关联的标签可以标明重构和/或使用的指导。标签可进一步指明所述制剂可用于或意欲用于皮下施用。装有所述制剂的容器可以是多次使用的小瓶,其容许重复施用(例如,2-6次施用)重构制剂。所述制品可进一步包含含有适合的稀释剂(例如,BWFI)的第二容器。一旦混合所述稀释剂和冻干制剂,在重构制剂中的最终蛋白浓度一般是至少 50mg/ml。所述制品可进一步包含从商业和用户立场出发需要的其它材料,包括其它的缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器和带使用说明书的包装说明书。

[0197] 通过参考以下实施例将能更充分地理解本发明。然而,这些实施例不应当被看作是对本发明的范围的限制。在本公开文本中的所有引文所在此明确引入作为参考。

[0198] 实施例 1- 溶液中蛋白质粘度的研究

[0199] 这一实施例阐述了对各种含有抗体的制剂的粘度的测量。

[0200] 评估了溶液中抗-CD4 单克隆抗体的各种水性制剂的粘度。具体而言,在这一研究中,制备了含有各种浓度的抗-CD4 单克隆抗体的缓冲溶液(20mM 组氨酸-琥珀酸盐, pH6.3),并测定所获得的溶液的粘度。就此而言,应用标准的锥板流变仪(TA Instruments AR-G2 应力流变仪,应用 20mm 直径、1 度锥以及水溶剂阱),在 25°C 及 10001/s 的剪切速率测量粘度。上样后,开始收集数据之前,允许每一样品在 25°C 平衡 2 分钟。收集数据至少 2 分钟,以确保达到稳定状态。通过透析和/或添加干的赋形剂至浓缩蛋白溶液中制备溶液,从而达到期望的最终赋形剂浓度。将样品贮存于 2-8°C,直到在上样之前恢复至室温。通过重量(gravimetric)稀释,应用 UV 吸收光谱进行每一样品的蛋白浓度测量。在制备的 2 周内(通常 2-3 天内)测量样品。这些初始分析的结果显示于下面的表 I 中。表 I

	<u>抗体浓度 (mg/ml)</u>	<u>赋形剂</u>	<u>绝对粘度 (cP)</u>
	195.4 mg/ml 抗-CD4 抗体	无	75.3 cP
[0201]	219.2 mg/ml 抗-CD4 抗体	无	145.2 cP
	228.8 mg/ml 抗-CD4 抗体	无	193.7 cP
	245.8 mg/ml 抗-CD4 抗体	无	328.6 cP

[0202] 实施例 2- 精氨酸对含有抗体的水性制剂粘度的影响的研究

[0203] 这一实施例阐述了精氨酸-HCl 和精氨酸琥珀酸盐(精氨酸-S)如何影响含单克隆抗体的水性制剂的粘度。

[0204] 评估了抗-CD4 单克隆抗体水性制剂溶液中精氨酸-HCl 和精氨酸琥珀酸盐的降低粘度的作用。具体地,在这一研究中,制备了含有各种浓度的抗-CD4 单克隆抗体以及各种浓度的游离精氨酸的缓冲溶液(20mM 组氨酸-琥珀酸盐, pH6.3),并如上文描述的那样确定所获溶液的粘度。这些分析的结果显示于下面的表 II 中。

[0205] 表 II

[0206]

<u>抗体浓度 (mg/ml)</u>	<u>赋形剂</u>	<u>绝对粘度 (cP)</u>
243.3 mg/ml 抗-CD4 抗体	30 mM 精氨酸-HCl	128.8 cP
228.0 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 精氨酸-S	34.4 cP
228.0 mg/ml 抗-CD4 抗体	410 mM 精氨酸-S	34.8 cP
235.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	1000 mM 精氨酸-S	49.9 cP

[0207] 表 II 显示的数据证实,缓冲的含抗-CD4 抗体的水性制剂是高粘性的,添加 30mM 精氨酸-HCl 显著地降低了所得溶液的粘度。而且,添加递增量的精氨酸琥珀酸盐具有降低粘度的作用。因此,这些数据证实,精氨酸-HCl 和具有琥珀酸根抗衡离子的精氨酸(例如,精氨酸琥珀酸盐)作为用于降低含有高浓度蛋白质的制剂的粘度的有效的赋形剂/添加剂,由此使得这些制剂更适于通过皮下途径施用。

[0208] 实施例 3- 研究各种精氨酸衍生物、前体和结构类似物对含有抗体的水性制剂粘度的影响

[0209] 这一实施例阐述了各种精氨酸衍生物、前体和结构类似物如何影响含单克隆抗体的水性制剂的粘度。

[0210] 由于实施例 2 的数据证实了精氨酸-HCl 和精氨酸琥珀酸盐对降低含高浓度抗体的制剂的粘度具有有益效果,我们接下来试图确定各种不同的精氨酸衍生物、前体和结构类似物对此类含有蛋白质的制剂所具有的作用。具体地,在以下研究中,制备了含有各种浓度的抗-CD4 单克隆抗体以及各种浓度的不同精氨酸衍生物、前体或类似物的缓冲溶液(20mM 组氨酸-琥珀酸盐, pH6.3),并如上文描述的那样应用标准的锥板流变仪测定所获溶液的粘度。更具体地,应用标准的锥板流变仪(TA Instruments AR-G2 应力流变仪,应用 20mm 直径、1 度锥以及水溶剂阱),在 25°C 及 10001/s 的剪切速率测量粘度。上样后,开始收集数据之前,允许每一样品在 25°C 平衡 2 分钟。收集数据至少 2 分钟,以确保达到稳定状态。通过透析和/或添加干赋形剂至浓缩蛋白溶液中制备溶液,从而达到期望的最终赋形剂浓度。将样品贮存于 2-8°C,直到在上样之前恢复至室温。通过重量稀释,应用 UV 吸收光谱进行每一样品的蛋白浓度测量。

[0211] A. 精氨酸寡肽

[0212] 如上述那样测定添加精氨酸二肽、精氨酸三肽或聚精氨酸至水性抗-CD4 单克隆抗体制剂的作用。这些分析的结果显示于下面的表 III 中。

[0213] 表 III

[0214]

<u>抗体浓度 (mg/ml)</u>	<u>赋形剂</u>	<u>绝对粘度 (cP)</u>
243.9 mg/ml 抗-CD4 抗体	30 mM 精氨酸二肽	85.3 cP
243.9 mg/ml 抗-CD4 抗体	30 mM 精氨酸三肽	67.3 cP
221.6 mg/ml 抗-CD4 抗体	150 mM 精氨酸二肽	40.8 cP

	227.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	150 mM 精氨酸三肽	34.7 cP
[0215]	206.8 mg/ml 抗-CD4 抗体	0.1 mg/ml 聚精氨酸 (MW = 5,000-15,000)	89.6 cP

[0216] B. 改变精氨酸侧链长度

[0217] 如上述那样测定改变基于精氨酸的赋形剂的侧链长度对水性抗-CD4 单克隆抗体制剂的影响。这些分析的结果显示于下面的表 IV 中。

[0218] 表 IV

	<u>抗体浓度 (mg/ml)</u>	<u>赋形剂</u>	<u>绝对粘度 (cP)</u>
	226.4 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 高精氨酸	32.9 cP
[0219]	230.0 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 2-氨基-3-胍基丙酸	33.5 cP

[0220] C. 移除精氨酸官能团

[0221] 如上述那样确定从基于精氨酸的赋形剂中移除不同官能团对抗-CD4 单克隆抗体水性制剂的影响。这些分析的结果显示于下面的表 V 中。

[0222] 表 V

	<u>抗体浓度 (mg/ml)</u>	<u>赋形剂</u>	<u>绝对粘度 (cP)</u>
	239.4 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 胍	74.4 cP
[0223]	243.4 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 鸟氨酸	67.3 cP
	220.4 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 胍丁胺	27.4 cP
	231.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 胍基丁酸	82.3 cP

[0224] D. 其他相关化合物

[0225] 还分析了其他精氨酸-相关化合物对制剂粘度的影响, 结果显示于下面的表 VI 中。表 VI

[0226]

<u>抗体浓度 (mg/ml)</u>	<u>赋形剂</u>	<u>绝对粘度 (cP)</u>
233.8 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 尿素	66.4 cP
235.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 瓜氨酸	131.3 cP
218.8 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 刀豆氨酸	842.6 cP
230.2 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM N-羟基- 降-精氨酸	44.1 cP
225.0 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 硝基精氨酸甲酯	28.2 cP
227.4 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM NG-NG-二甲基- 精氨酸二盐酸盐	419.9 cP
236.2 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 精氨酸酰胺	34.6 cP
224.2 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 精氨酸甲酯	25.1 cP
239.3 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 精氨酸乙酯	35.9 cP
236.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 赖氨酸甲酯	39.0 cP
245.7 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 赖氨酸	78.7 cP
243.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 赖氨酸酰胺	55.1 cP
245.1 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 组氨酸	63.6 cP
246.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 组氨酸甲酯	109.0 cP
245.9 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 组胺	46.3 cP
249.2 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 丙氨酸	35.3 cP
247.1 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 丙氨酸酰胺	88.0 cP
247.9 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 丙氨酸甲酯	84.6 cP
248.1 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 谷氨酸酰胺	206.3 cP
248.4 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM γ -氨基丁酸	197.6 cP
240.7 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 谷氨酸酰胺甲酯	1396.0 cP
227.4 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 腐胺	31.5 cP
239.8 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 尸胺	39.5 cP
232.7 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 亚精胺	36.8 cP

	238.6 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 精胺	35.0 cP
	230.1 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 甲硫氨酸	110.8 cP
[0227]	250.2 mg/ml 抗-CD4 抗体	200 mM 胍、	
		200 mM 铵 HCl	67.0 cP
	251.2 mg/ml 抗-CD4 抗体	100 mM 胍、	
		100 mM 铵 HCl	105.7 cP

[0228] E. 小结

[0229] 上表 I 的数据证实精氨酸（精氨酸-HCl 或精氨酸琥珀酸盐）是有效降低含高浓度蛋白的溶液的粘度的赋形剂。基于这一数据，进行了其他的实验，以测试各种其他“精氨酸-相关”赋形剂对含高浓度蛋白的水性溶液粘度的影响。如表 II-VI 所示，证实了许多其他测试的赋形剂具有降低粘度的作用。有趣的是，其他结构相关的赋形剂（例如，刀豆氨酸和 NG-NG-二甲基-精氨酸二盐酸盐）实际上起到升高含高浓度蛋白的溶液的粘度的作用，证实精氨酸的结构同系性不能预测化合物对含蛋白溶液可能具有的作用。

[0230] 实施例 4- 研究粘度对赋形剂浓度的依赖

[0231] 这一实施例阐述了改变赋形剂浓度对含单克隆抗体的水性制剂的粘度的影响。

[0232] 评估了以上实施例 3 所示能够降低高浓度的含蛋白溶液的粘度的两种赋形剂的各种不同浓度的降低粘度作用。具体地，在这一研究中，制备了含有各种浓度的抗-CD4 单克隆抗体以及各种不同浓度的胍丁胺或高精氨酸的缓冲溶液（20mM 组氨酸-琥珀酸盐，pH6.3），并如上所述那样确定所得溶液的粘度。这些分析的结果显示于表 VII 中，其中提供的粘度测量结果表示从相同水性制剂的两次独立分析中获得的测量结果的平均值。

[0233] 表 VII

	<u>抗体浓度 (mg/ml)</u>	<u>赋形剂</u>	<u>粘度 (cP)</u>
	234.4 mg/ml 抗-CD4 抗体	11 mM 精氨酸	149.1 cP
	232.0 mg/ml 抗-CD4 抗体	52 mM 精氨酸	70.5 cP
	234.0 mg/ml 抗-CD4 抗体	11 mM 胍丁胺	122.2 cP
	232.7 mg/ml 抗-CD4 抗体	55 mM 胍丁胺	59.7 cP
	231.7 mg/ml 抗-CD4 抗体	107 mM 胍丁胺	46.4 cP
	230.8 mg/ml 抗-CD4 抗体	204 mM 胍丁胺	36.1 cP
[0234]	224.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	469 mM 胍丁胺	28.8 cP
	215.3 mg/ml 抗-CD4 抗体	895 mM 胍丁胺	27.0 cP
	234.2 mg/ml 抗-CD4 抗体	10 mM 高精氨酸	153.9 cP
	232.0 mg/ml 抗-CD4 抗体	50 mM 高精氨酸	71.7 cP
	229.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	101 mM 高精氨酸	44.5 cP
	224.3 mg/ml 抗-CD4 抗体	196 mM 高精氨酸	29.6 cP
	216.5 mg/ml 抗-CD4 抗体	449 mM 高精氨酸	21.8 cP
	200.9 mg/ml 抗-CD4 抗体	819 mM 高精氨酸	21.1 cP

[0235] 上表 VII 的数据证实了上文实施例 3 中所示的具有降低粘度作用的赋形剂的粘度降低效果在很宽的浓度范围内发生。更具体来讲,从表 VII 的数据可显而易见地看到,粘度降低作用通常在约 10mM 的浓度范围周围变得明显,并且在直到接近 900mM 至 1M 的浓度下增强并保持。从这些数据,人们将预期本文证实具有粘度降低作用的赋形剂将在约 10mM(包括 10mM)至约 1M(包括 1M)的很宽的浓度范围内展示出所述作用。