



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106661111 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201580037513.2

D.M. 邓利维

(22)申请日 2015.05.15

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30)优先权数据

代理人 曹立莉 何伟

61/994,427 2014.05.16 US

62/093,734 2014.12.18 US

62/095,181 2014.12.22 US

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

A61P 7/00(2006.01)

A61P 21/00(2006.01)

A61P 37/08(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.01.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2015/053602 2015.05.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/173782 EN 2015.11.19

(71)申请人 葛兰素史密斯克莱知识产权管理有
限公司

地址 英国米德尔塞克斯

(72)发明人 A.布莱克-哈斯金斯 T.马歇尔

K.奥贝里 M.D.珀金斯

G.H.克罗特斯 M.普里

权利要求书2页 说明书37页

序列表12页 附图14页

(54)发明名称

抗体制剂

(57)摘要

本发明涉及药物活性抗原结合蛋白(例如单克隆抗体)的药物制剂。该制剂除了抗原结合蛋白外还包含缓冲剂和张度剂。

1. 抗原结合蛋白的药物制剂,其包含:
 - a. 约150至250mg/mL的抗原结合蛋白;
 - b. 约1至100mM的缓冲剂,提供约5.0至约7.0的pH;和
 - c. 约70至170mM的张度剂。
2. 抗原结合蛋白的药物制剂,其包含抗原结合蛋白、组氨酸、精氨酸、NaCl和聚山梨醇酯80。
3. 权利要求2的药物制剂,其包含约200mg/mL抗原结合蛋白、约10mM组氨酸、约25mM精氨酸、约115mM NaCl和约0.01%聚山梨醇酯80,pH为约6.0。
4. 权利要求1-3中任一项的药物制剂,其中所述抗原结合蛋白为单克隆抗体或其片段。
5. 权利要求4的药物制剂,其中所述单克隆抗体或其片段结合至BLyS (SEQ ID NO:1)或BLyS的异源三聚体或同源三聚体形式。
6. 权利要求4或5的药物制剂,其中所述单克隆抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区分别包含与SEQ ID NO:2和3具有90%同一性的氨基酸序列,或分别包含与SEQ ID NO:4和5具有90%同一性的氨基酸序列。
7. 权利要求4-6中任一项的药物制剂,其中所述单克隆抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链分别包含与SEQ ID NO:6和7具有90%同一性的氨基酸序列,或分别包含与SEQ ID NO:8和9具有90%同一性的氨基酸序列。
8. 权利要求4-7中任一项的药物制剂,其中所述单克隆抗体的浓度为 200 ± 20 mg/mL。
9. 前述权利要求中任一项的药物制剂,其中所述张度剂为氯化钠。
10. 权利要求9的药物制剂,其中所述氯化钠的浓度为 115 ± 10 mM。
11. 前述权利要求中任一项的药物制剂,其中所述缓冲剂为组氨酸。
12. 权利要求11的药物制剂,其中所述组氨酸的浓度为约5至15mM。
13. 权利要求12的药物制剂,其中所述组氨酸的浓度为 10 ± 2 mM。
14. 前述权利要求中任一项的药物制剂,进一步包含约1mM至100mM的稳定剂。
15. 权利要求14的药物制剂,其中所述稳定剂为氨基酸。
16. 权利要求15的药物制剂,其中所述氨基酸为精氨酸。
17. 权利要求16的药物制剂,其中所述精氨酸的浓度为约20mM至30mM。
18. 权利要求17的药物制剂,其中所述精氨酸的浓度为 25 ± 2 mM。
19. 前述权利要求中任一项的药物制剂,还包含约0.005至0.015% (w/v) 的非离子型表面活性剂。
20. 权利要求19的药物制剂,其中所述非离子型表面活性剂为聚山梨醇酯80。
21. 权利要求20的药物制剂,其中所述聚山梨醇酯80的浓度为约0.01% (w/v)。
22. 前述权利要求中任一项的药物制剂,其在冷冻-解冻期间保持稳定。
23. 前述权利要求中任一项的药物制剂,其中所述缓冲剂提供 6.0 ± 0.2 的pH。
24. 前述权利要求中任一项的药物制剂,其用于皮下或肌肉给药。
25. 前述权利要求中任一项的药物制剂,其为液体形式或重构形式。
26. 权利要求1-23中任一项的药物制剂,其为冻干或喷雾干燥形式。
27. 前述权利要求中任一项的药物制剂,其用于治疗疾病或障碍,所述疾病或障碍对抗-BLyS抗体的治疗有顺应性。

28. 一种注射装置,其包含权利要求4-26中任一项的抗-BLyS抗体制剂。

29. 权利要求28的注射装置,其中所述药物制剂与皮质类固醇相伴或相继地共同给药。

30. 用于在受试者中治疗疾病或病症的方法,所述疾病或病症对抗-BLyS抗体的治疗有顺应性,所述方法包括以对治疗所述疾病或病症有效的量在受试者中给药权利要求4-26中任一项的制剂。

31. 权利要求30的方法,其中所述疾病或病症选自:系统性红斑狼疮、抗嗜中性白细胞胞质抗体(“ANCA”)血管炎、狼疮性肾炎、原发性舍格伦综合征、慢性免疫性血小板减少症、重症肌无力、症状性瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、等待肾移植的患者的免疫脱敏、膜性肾病、系统性硬化病、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、多发性硬化和肾衰竭。

32. 一种试剂盒,其包含:一个或多个小瓶,其含有权利要求1-26中任一项的制剂;和指示向患者皮下给药所述制剂的说明书。

33. 权利要求32的试剂盒,其进一步包含用于向患者皮下给药所述制剂的注射装置。

34. 权利要求1-26中任一项的制剂,其用于治疗疾病,所述疾病选自:系统性红斑狼疮、抗嗜中性白细胞胞质抗体(“ANCA”)血管炎、狼疮性肾炎、原发性舍格伦综合征、慢性免疫性血小板减少症、重症肌无力、症状性瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、等待肾移植的患者的免疫脱敏、膜性肾病、系统性硬化病、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、多发性硬化和肾衰竭。

抗体制剂

[0001] 发明背景

[0002] 本发明涉及药物活性抗原结合蛋白(例如单克隆抗体)的药物制剂。该制剂除了抗原结合蛋白外还包含缓冲剂和张度剂。

[0003] 抗体的药学使用在过去几年中有所增加。在很多情况中,该抗体通过静脉内(IV)途经注射。不幸的是,可通过静脉内途经注射的抗体的量受到该抗体理化性质的限制,尤其是受到其在合适的液体制剂中的溶解度和稳定性和输注流体体积的限制。其它的给药途径为皮下或肌内注射,这些途径在患者顺应性和容易给药方面提供潜在的益处。这些注射途径要求在将被注射的最终溶液中存在高蛋白质浓度。

[0004] 因此,希望提供具有治疗活性的抗原结合蛋白(如用于皮下注射的抗体)的高浓度的稳定皮下注射制剂。皮下注射的优点在于其允许在实施该注射时医生对患者的干预相当短。此外可训练患者自己来进行皮下注射。这种自施用在维持给药期间尤其有用,因为不需要住院治疗(减少对医疗资源的使用)。通常通过皮下途径的注射被限于大约2mL。对于要求多次剂量的患者,可在人体表面多个位点注射数个单元剂量的制剂。

[0005] 发明概述

[0006] 在一方面,本发明提供了抗原结合蛋白的药物制剂,其包含缓冲剂和张度剂。更具体地,本发明提供了约150至250mg/mL的抗原结合蛋白;约1至100mM的缓冲剂以提供约5.0至约7.0的pH;和约70至170mM的张度剂。在一个实施方案中,所述抗原结合蛋白为抗-BLyS抗体。

[0007] 在另一方面,本发明提供了抗原结合蛋白的药物制剂,其包含缓冲剂、稳定剂、张度剂和非离子型表面活性剂。更具体地,本发明提供了药物制剂,其包含抗原结合蛋白、组氨酸、精氨酸、NaCl和聚山梨醇酯80。在一个实施方案中,所述抗原结合蛋白为抗-BLyS抗体。

[0008] 在另一方面,本发明提供了在受试者中治疗疾病或病症的方法,所述疾病或病症对抗-BLyS抗体的治疗有顺应性,所述方法包括以对治疗所述疾病或病症有效的量在受试者中给药本发明的制剂。在一方面,所述疾病或病症为自身免疫疾病或障碍。

[0009] 在另一方面,本发明提供了试剂盒,其包含含有本发明的制剂的一个或多个小瓶以及向患者皮下给药所述制剂的说明书。

[0010] 在另一方面,本发明提供了包含本申请所述的稳定的抗-BLyS抗体制剂的注射装置。

[0011] 在另一方面,本发明提供了根据本发明的制剂,其用于治疗选自以下的疾病:系统性红斑狼疮、抗嗜中性白细胞胞质抗体(“ANCA”)血管炎、狼疮性肾炎、原发性舍格伦综合征(primary Sjögren syndrome)、慢性免疫性血小板减少症、重症肌无力、症状性瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(symptomatic Waldenström macroglobulinaemia)、等待肾移植的患者的免疫脱敏、膜性肾病、系统性硬化病、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、多发性硬化和肾衰竭。

附图说明

- [0012] 图1显示了蛋白质浓度对制剂1的聚集速率的影响。
- [0013] 图2显示了在2-8℃存放5¹/₄个月后制剂1和5的混浊度。
- [0014] 图3显示了贝利单抗 (belimumab) 的粘度与浓度之间的关系。
- [0015] 图4显示了在2-8℃储存3个月后不同制剂的聚集百分比 (%) 的变化。
- [0016] 图5显示了不同制剂在不同温度储存3个月后的聚集百分比 (%) 的变化。
- [0017] 图6显示了在至多25℃储存5¹/₄个月后温度对聚集速率的影响,并显示了与制剂1 (实心方块 (filled square)) 相比,精氨酸制剂 (图中的空心方块) 显著地使聚集减弱。
- [0018] 图7显示了125至200mg/mL的制剂1 (实心方块;06-C) 和制剂5 (空心方块;06-D) 在-80℃至40℃储存5¹/₄个月后的聚集速率,以及制剂5 (虚线) 一致地显示出比制剂1 (实线) 更低的聚集速率。
- [0019] 图8显示了125至200mg/mL的制剂1 (06-C) 和5 (06-D) 在-80℃至40℃储存5¹/₄个月后降低的CGE降解速率。
- [0020] 图9显示了125至200mg/mL的制剂1 (实心方块;06-C) 和5 (空心方块;06-D) 在-80℃至40℃储存5¹/₄个月后的酸化速率 (acidic rate)。
- [0021] 图10显示了125至200mg/mL的制剂1和5在-80℃至40℃储存5¹/₄个月后的贝利单抗重链氧化水平。
- [0022] 图11显示了200mg/mL的制剂1储存5¹/₄个月后的贝利单抗肽谱。
- [0023] 图12显示了200mg/mL的制剂5储存5¹/₄个月后的贝利单抗肽谱。
- [0024] 图13显示了不同精氨酸水平的贝利单抗样品的肽谱。
- [0025] 图14显示了HTF pH-缓冲剂筛选。
- [0026] 图15显示了二因素相互作用-pH x缓冲剂-SEC单体。
- [0027] 图16显示了二因素相互作用-pH x缓冲剂-cIEF主峰 (cIEF main)。
- [0028] 图17显示了不同浓度的抗-IL13抗体的粘度。
- [0029] 图18显示了振动研究中抗-IL13T=0样品的粘度 (cP) 相比于浓度 (mg/mL) 结果。
- [0030] 图19显示,7天的乙酸盐样品被凝胶化 (左侧)。在琥珀酸盐或组氨酸样品 (中间及右侧) 中没有观察到凝胶。观察到10天的琥珀酸盐小瓶为半凝胶状态。
- [0031] 图20显示了3个月的化学稳定性样品的近紫外圆二色谱的比较。
- [0032] 发明详述
- [0033] 应理解本发明不限于具体的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,当然可以对以上进行变化。还应理解本申请所用术语仅为了描述具体的实施方案,并不旨在进行限制。除非该内容被另外明确说明,否则本说明书以及所附权利要求中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代。因此,例如,提及“一种多肽”包括了两种或更多种多肽等的组合。
- [0034] 本申请所用的“约”在指代可测量数值 (如量、持续时间等) 时意在涵盖相对于具体数值±20%或±10%的变化,包括±5%、±1%和±0.1%,因为这些变化适于进行所公开的方法。
- [0035] 除非另外定义,本申请所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通

技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本申请公开相似或相同的任何方法和材料都可用于测试本发明的实践中,但本申请描述了优选的材料和方法。在描述并要求本发明的权利时,将使用以下术语。

[0036] 在一方面,本发明提供了抗原结合蛋白的药物制剂,其包含缓冲剂和张度剂。在另一方面,本发明提供了抗原结合蛋白的药物制剂,其包含缓冲剂、稳定剂、张度剂和非离子表面活性剂。在一个实施方案中,所述制剂被冻干或被喷雾干燥。在一些实施方案中,所述制剂被冻干或被喷雾干燥并且随后用分散剂重构。在一个实施方案中,所述分散剂为无菌水或“注射用水”(WFI)。所述抗原结合蛋白可在给药前用等渗盐水或其它赋形剂进一步稀释以产生期望的浓度。在一个实施方案中,所述制剂为重构制剂。在另一个实施方案中,所述制剂为液体药物制剂。

[0037] 术语“药物制剂”或“制剂”是一种制品,其采用的形式使得活性成分的生物活性有效,并且不含对该制剂所施用的受试者具有不可接受的毒性的其它成分。该制剂为无菌的。

[0038] “无菌的”制剂为无菌性的或不含有所有活的微生物或其孢子。

[0039] 在本发明的示例性实施方案中,液体制剂呈现期望的特性,如期望的粘度和表面张力特性。

[0040] 术语“表面张力”是指位于表面以下的分子作用在表面/空气界面处的那些分子上的吸引力,其产生于相对于气体的低分子浓度的液体的高分子浓度。具有低表面张力值的液体,如非极性液体,比水更容易流动。典型地,表面张力值以牛顿/米或达因/厘米表示。

[0041] 本申请所引用的“动态表面张力”是表面/空气界面以及对表面/表面界面的动态界面张力。存在多种可选择的测量动态表面张力的方法,例如,封闭气泡表面张力测量法(captive bubble surface tensionometry)或脉动气泡表面张力测量法(pulsating bubble surface tensionometry)。

[0042] 术语“粘度”是指流体在特定温度下对流动呈现出的内部阻力;剪切应力与剪切速率的比率。如果1达因/平方厘米的力造成两个面积为1平方厘米且相隔1平方厘米的平行的液体表面以1cm/秒的速度相对移动,则液体具有1泊的粘度。1泊等于100厘泊。

[0043] 在一个实施方案中,包含缓冲剂和稳定剂的制剂的粘度相比于不存在缓冲剂和稳定剂的制剂的粘度降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%或至少约30%。在一个实施方案中,包含缓冲剂和稳定剂的制剂的粘度为小于约50cP、小于约45cP、小于约40cP、小于约35cP、小于约30cP、小于约25cP、小于约20cP、小于约15cP或小于约10cP。

[0044] 当提及表观粘度时,应理解粘度的数值取决于进行测量时的条件,如所用的温度、剪切速率和剪切应力。表观粘度被定义为剪切应力与施加的剪切速率的比率。存在多种可选择的测量表观粘度的方法。例如,粘度可通过合适的锥和板、平行的板或其它类型的粘度计或流变仪测试。

[0045] “凝胶化”被定义为形成硬网状物的过程,推测该网状物是由于聚合MAb或丝状物之间发生拓扑结构重叠(topological overlap)以及这些丝状物之间的交联和成束而产生的。这种硬网状物显示为溶液弹性模量(G')以及增加的固有弹性模量(G'')。”

[0046] 在一方面,本发明涉及降低或抑制溶液凝胶化的方法,其包括使用本发明的制剂。在另一方面,本发明涉及降低或抑制包含治疗性蛋白的溶液的凝胶化的方法,该方法包括

向溶液施加组氨酸和氯化钠。

[0047] 在本申请中“多肽”、“肽”和“蛋白”可互换使用,指代氨基酸残基的聚合物。多肽可来自天然来源(衍生自组织)、由原核或真核细胞制备物进行的重组或天然表达、或通过合成方法化学制备。该术语适用于氨基酸聚合物(其中一个或多个氨基酸残基为相应的天然存在氨基酸的人造化学模拟物)以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。氨基酸模拟物是指这样的化学化合物,其具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但功能与天然存在的氨基酸相似。在科学和专利文献中详细描述了非天然残基;以下描述了几种可用作天然氨基酸残基模拟物的示例性非天然组合物以及指导原则。芳族氨基酸的模拟物可通过替代为以下化合物而产生,例如D-或L-萘基丙氨酸;D-或L-苯基甘氨酸;D-或L-2噻吩基(thieneyl)丙氨酸;D-或L-1-,2-,3-或4-苊基丙氨酸;D-或L-3噻吩基丙氨酸;D-或L-(2-吡啶基)-丙氨酸;D-或L-(3-吡啶基)-丙氨酸;D-或L-(2-吡嗪基)-丙氨酸;D-或L-(4-异丙基)-苯基甘氨酸;D-(三氟甲基)-苯基甘氨酸;D-(三氟甲基)-苯基丙氨酸;D-对-氟-苯基丙氨酸;D-或L-对-联苯基苯基丙氨酸;K-或L-对-甲氧基-联苯基苯基丙氨酸;D-或L-2-吡啶(烷基)丙氨酸;和D-或L-烷基丙氨酸(ainine),其中烷基可为取代或未取代的甲基、乙基、丙基、己基、丁基、戊基、异丙基、异丁基、仲丁基(sec-isotyl)、异戊基或非酸性的氨基酸。非天然氨基酸的芳香环包括,例如,噻唑基、噻吩基(thiophenyl)、吡唑基、苯并咪唑基、萘基、呋喃基、吡咯基和吡啶基芳香环。

[0048] 本申请所用的“肽”包括作为本申请具体例举的那些肽的保守变体的肽。本申请所用的“保守变体”是指将氨基酸残基替换为另一种生物上相似的残基。保守变体的实例包括但不限于:用一个疏水性残基,如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸、正亮氨酸或甲硫氨酸替换另一个疏水性残基;或用一个极性残基替换另一个极性残基,如用精氨酸替换赖氨酸、用谷氨酸替换天冬氨酸或用谷氨酰胺替换天冬酰胺等。可彼此替换的中性亲水性氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸和苏氨酸。“保守变体”还包括使用取代的氨基酸代替未取代的母体氨基酸,前提是针对该取代的多肽的抗体也与未取代的多肽发生免疫反应。该保守取代物落入本发明的肽的类别的定义内。可通过本领域技术人员已知的标准方法以及本申请中描述的方法确定所述肽的生物活性。

[0049] 当关于蛋白使用“重组”时,表示该蛋白已通过引入异源核酸或蛋白或者改变天然核酸或蛋白进行修饰。

[0050] 本文所用的“治疗性蛋白”指的是(例如)研究者或临床医生所寻找的、可向哺乳动物给药以引出组织、系统、动物或人类的生物学或医学应答的任何蛋白和/或多肽。治疗性蛋白可引出多于一种生物学或医学应答。此外,术语“治疗有效量”是指与未接受该量的相应的受试者相比,导致(但不限于)疾病、障碍或副作用痊愈、预防或减轻,或者疾病或障碍进展速率降低的任何量。该术语在其范围内还包括有效增强正常生理功能的量以及在患者中有效地引起增强或有助于第二种药物的治疗作用的生理功能的量。

[0051] 本申请鉴定的所有“氨基酸”残基是天然L-构型。与标准多肽命名一致,在下表中示出了氨基酸残基的简写。

[0052] 表1.氨基酸简写。

	1 个字母	3 个字母	氨基酸
	Y	Tyr	L-酪氨酸
	G	Gly	L-甘氨酸
	F	Phe	L-苯丙氨酸
	M	Met	L-甲硫氨酸
	A	Ala	L-丙氨酸
	S	Ser	L-丝氨酸
	I	Ile	L-异亮氨酸
	L	Leu	L-亮氨酸
[0053]	T	Thr	L-苏氨酸
	V	Val	L-缬氨酸
	P	Pro	L-脯氨酸
	K	Lys	L-赖氨酸
	H	His	L-组氨酸
	Q	Gln	L-谷氨酰胺
	E	Glu	L-谷氨酸
	W	Trp	L-色氨酸
	R	Arg	L-精氨酸
	D	Asp	L-天冬氨酸
	N	Asn	L-天冬酰胺
[0054]	C	Cys	L-半胱氨酸

[0055] 应注意,所有氨基酸残基序列在本申请中通过通式表示,其从左到右的指向与常规的氨基末端至羧基末端的方向一致。

[0056] 在另一个实施方案中,所述多肽为抗原结合蛋白。在一个实施方案中,所述抗原结合蛋白选自可溶性受体、抗体、抗体片段、免疫球蛋白单可变域、Fab、F(ab')₂、Fv、二硫化物连接的Fv、scFv、闭合构象的多特异性抗体、二硫键连接的scFv或双特异性抗体。

[0057] 本申请所用的术语“抗原结合蛋白”是指能够结合至抗原的抗体、抗体片段和其它蛋白构造。

[0058] 术语Fv、Fc、Fd、Fab或F(ab)₂以其标准含义使用(参见,例如,Harlow等人, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988))。

[0059] “嵌合抗体”是指一种类型的工程化抗体,其含有衍生自供体抗体的天然存在的可变区(轻链和重链)和衍生自受体抗体的轻链和重链恒定区。

[0060] “人源化抗体”是指一种类型的工程化抗体,其CDR衍生自非人类供体免疫球蛋白,且该分子的其它源自免疫球蛋白的部分衍生自一种(或多种)人类免疫球蛋白。此外,可改变框架支持残基(framework support residues)以保持结合亲和力(参见,例如,Queen等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10032 (1989), Hodgson等人, *Bio/Technology*, 9:421 (1991))。合适的人类受体抗体可通过与供体抗体的核苷酸序列和氨基酸序列的同源性,而选自常规数据库中的一种抗体,该数据库例如为:KABATTM数据库、Los Alamos数据库和Swiss Protein数据库。通过与供体抗体的框架区的同源性而表征(基于氨基酸)的人抗体可适于提供用于插入供体CDR的重链恒定区和/或重链可变框架区。可以相似方式选择能

够贡献轻链恒定框架区或可变框架区的合适的受体抗体。应注意,受体抗体重链和受体抗体轻链不必源自相同的受体抗体。现有技术描述了几种产生该人源化抗体的方法—例如参见EP-A-0239400和EP-A-054951。

[0061] 术语“供体抗体”是指向第一免疫球蛋白伴侣提供其可变区、CDR或其它功能性片段或其类似物的氨基酸序列的(单克隆和/或重组)抗体,从而提供了改变的免疫球蛋白编码区,并因此使具有抗原特异性和供体抗体的中和活性特征的改变的抗体得以表达。

[0062] 术语“受体抗体”是指与供体抗体异源的(单克隆和/或重组)抗体,其向第一免疫球蛋白伴侣提供了编码其重链和/或轻链框架区和/或其重链和/或轻链恒定区的全部氨基酸序列(或任何部分的氨基酸序列,但在一些实施方案中为全部氨基酸序列)。在一些实施方案中,人抗体为受体抗体。

[0063] “CDR”被定义为抗体的互补决定区氨基酸序列,其为免疫球蛋白重链和轻链的高变区。参见,例如,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第4版,U.S.Department of Health and Human Services,National Institutes of Health (1987)。在免疫球蛋白的可变部分存在三个重链CDR和三个轻链CDR(或CDR区)。因此,本申请所用的“CDR”是指所有三个重链CDR或所有三个轻链CDR(或所有重链CDR和所有轻链CDR,如果合适的话)。抗体的结构和蛋白折叠可意味着其它残基被认为是抗原结合区的一部分,且本领域技术人员也将如此理解。例如参见,Chothia等人,(1989) Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions;Nature 342,p 877-883。

[0064] 本申请所用的术语“结构域”是指折叠的蛋白结构,其三级结构独立于该蛋白其余部分。通常,结构域负责蛋白的不同的功能性质,并且在很多情况中可被添加、除去或转移到其它蛋白,而不损失蛋白和/或该结构域의其它部分的功能。“抗体单可变域”为折叠的多肽结构域,其包含抗体可变域的特征序列。因此,其包括完整的抗体可变域和修饰的可变域(例如,其中一个或多个环区被替换为不具有抗体可变域特性的序列)或包括被截短或包含N-端或C-端延伸的抗体可变域,以及包括至少保留全长结构域的结合活性和特异性的可变域的折叠片段。

[0065] 短语“免疫球蛋白单可变域”是指独立于不同的V区或V结构域,特异性结合至抗原或表位的抗体可变域(V_H 、 V_{HH} 、 V_L)。免疫球蛋白单可变域可以结合其它不同的可变区或可变域的形式存在(例如,同源或异源多聚体),其中对于单一免疫球蛋白可变域的抗原结合来说,其它的区或结构域不是必需的(即,其中免疫球蛋白单可变域以独立于额外的可变域的方式结合抗原)。本文所用的术语“域抗体”或“dAb”与能够结合至抗原的“免疫球蛋白单一可变域”是相同的。。免疫球蛋白单可变域可为人抗体可变域,但也包括来自其它物种的单抗体可变域,如啮鼠动物(例如W000/29004所公开的那些)、铰口鲨和骆驼科的 V_{HH} dAb(纳米抗体)。骆驼科 V_{HH} 为衍生自包括骆驼、美洲驼、羊驼、单峰骆驼和原驼的物种的免疫球蛋白单可变域多肽,其产生天然不含轻链的重链抗体。该 V_{HH} 域可根据本领域已存在的技术被人源化,并且该域仍被认为是本发明的“域抗体”。本申请所用的“ V_H ”包括骆驼科 V_{HH} 域。NARV是另一种类型的免疫球蛋白单可变域,其被鉴定为存在于软骨鱼中,包括铰口鲨。这些域也被称为新抗原受体可变区(通常简写为V(NAR)或NARV)。关于进一步的详情参见Mol. Immunol. 44, 656-665 (2006) 和US20050043519A。

[0066] 术语“表位结合域”是指,独立于不同的V区或V域,特异性结合抗原或表位的结构

域,其可为域抗体(dAb),例如人、骆驼科或鲨鱼的免疫球蛋白单可变域。

[0067] 本申请所用的术语“抗原结合位点”是指蛋白上能够特异性结合抗原的位点,其可为单结构域,例如表位结合域,或者可为成对的 V_H/V_L 结构域,如可在标准抗体上发现的那样。在本发明的一些方面,单链Fv(ScFv)域可提供抗原结合位点。

[0068] 本申请使用术语“mAbdAb”和“dAbmAb”来指代本发明的抗原结合蛋白。这两个术语可互换使用,并旨在具有与本申请所用相同的意思。

[0069] 本发明的药物制剂提供了:约150至250mg/mL的抗原结合蛋白;用于提供约5.0至约7.0的pH的约1至100mM的缓冲剂;和约70至170mM的张度剂。或者,本发明的药物制剂提供:约150至250mg/mL的抗原结合蛋白;用于提供 6.0 ± 0.5 的pH的约1至100mM的缓冲剂;约1至100mM的稳定剂;约90至150mM的张度剂;和约0.005至0.015% (w/v) 的非离子型表面活性剂。在一个实施方案中,该抗原结合蛋白为抗-B淋巴细胞刺激剂(抗-BLyS)蛋白抗体。

[0070] 还描述了包含以下的药物制剂:约150至250mg/mL的抗原结合蛋白;约1至100mM的组氨酸,pH为 6.0 ± 0.5 ;约70至170mM的NaCl。在一个实施方案中,该制剂还包含约0.005至0.03% (w/v) 的非离子型表面活性剂。在一个实施方案中,该制剂还包含约0.01至约0.1mM的金属螯合剂。在一个实施方案中,该抗原结合蛋白为抗-IL-13抗体。

[0071] 本发明的药物制剂可以液体形式提供,或者可以冻干形式提供。

[0072] 本发明的药物制剂包含缓冲剂。缓冲剂包括但不限于柠檬酸、HEPES、组氨酸、乙酸钾、柠檬酸钾、磷酸钾(KH_2PO_4)、乙酸钠、碳酸氢钠、柠檬酸钠、钠磷酸盐(NaH_2PO_4)、Tris碱和Tris-HCl。在一个实施方案中,该缓冲剂为组氨酸。在实施方案中,组氨酸浓度为约5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM或100mM。在一个实施方案中,组氨酸浓度为 10 ± 5 mM。在一个实施方案中,组氨酸浓度为 10 ± 2 mM。在一个实施方案中,组氨酸浓度为约10mM。在一个实施方案中,组氨酸浓度为约15mM。

[0073] 本申请所用的术语“提供约5.0至约7.0的pH的缓冲剂”是指这样的试剂,通过其酸/碱共轭组分的作用使得包含该试剂的溶液能抵抗pH变化。本发明的制剂中使用的缓冲液可具有约5.5至约6.5范围内的pH、或约5.8至约6.2范围内的pH。在一个实施方案中,pH为约6.0。在一个实施方案中,pH为约6.250。将pH控制在该范围内的缓冲剂的实例包括乙酸盐、琥珀酸盐、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐、双甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。根据本发明,最合适的缓冲剂为组氨酸(如L-组氨酸)缓冲剂。

[0074] “组氨酸缓冲剂”为包含组氨酸氨基酸的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸盐酸盐、组氨酸乙酸盐、组氨酸磷酸盐、组氨酸硫酸盐。实施例中鉴定的最合适的组氨酸制剂为:由0.65mg/mL的L-组氨酸、1.2mg/mL的L-组氨酸单盐酸盐制成的组氨酸缓冲剂。

[0075] 本发明的药物制剂包含张度剂。张度剂包括但不限于:右旋糖、甘油、甘露醇、氯化钾和氯化钠。在一个实施方案中,该张度剂为氯化钠。在一个实施方案中,氯化钠浓度为约70至170mM;约90–150mM;或约 115 ± 10 mM。在一些实施方案中,氯化钠浓度为约70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM、100mM、105mM、110mM、115mM、120mM、125mM、130mM、135mM、140mM、145mM、150mM、155mM、160mM、165mM、170mM或175mM。在一个实施方案中,氯化钠浓度为约115mM。在另一个实施方案中,氯化钠浓度为 150 ± 10 mM。在一个实施方案中,氯化钠浓度为约150mM。

[0076] “等渗”是指该制剂具有与人血液基本相同的渗透压。等渗制剂一般具有约250至350mOsm的渗透压。可使用蒸汽压或冰点下降式的渗透压计测量等渗性。

[0077] 在一些实施方案中,本发明的药物制剂包含稳定剂。稳定剂包括但不限于:人血清白蛋白(hsa)、牛血清白蛋白(bsa)、 α -酪蛋白、球蛋白、 α -乳白蛋白、LDH、溶菌酶、肌红蛋白、卵清蛋白和RNAaseA。稳定剂还包括氨基酸和它们的代谢产物,如:甘氨酸、丙氨酸(α -丙氨酸、 β -丙氨酸)、精氨酸、甜菜碱、亮氨酸、赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、肌氨酸、 γ -氨基丁酸(GABA)、奥品类(opines)(丙氨奥品、章鱼碱、甘氨奥品(strombine))和三甲胺的N-氧化物(TMAO)。在一个实施方案中,该稳定剂为氨基酸。在一个实施方案中,该氨基酸为精氨酸。在一个实施方案中,精氨酸浓度为约20至30mM。在一个实施方案中,精氨酸浓度为约 25 ± 2 mM。

[0078] 在一些实施方案中,本发明的药物制剂包含非离子型表面活性剂。非离子型表面活性剂包括但不限于聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯(如聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80)、聚乙烯-聚丙烯共聚物、聚乙烯-聚丙烯二醇、聚氧乙烯-硬脂酸酯、聚氧乙烯烷基醚、例如聚氧乙烯单月桂基醚、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆, Pluronic)、十二烷基硫酸钠(SDS)。在一个实施方案中,该非离子型表面活性剂为聚山梨醇酯80。在一个实施方案中,聚山梨醇酯80的浓度为约0.005至0.02% (w/v)。在一个实施方案中,聚山梨醇酯80的浓度为约0.01% (w/v)。在一个实施方案中,聚山梨醇酯80的浓度为约0.02% (w/v)。

[0079] 在一些实施方案中,本发明的药物制剂包含金属螯合剂。金属螯合剂包括但不限于EDTA和EGTA。在一个实施方案中,该金属螯合剂为EDTA。在一个实施方案中,EDTA的浓度为约0.01至约0.02mM。在一个实施方案中,EDTA的浓度为约0.05mM。

[0080] 在一个实施方案中,抗原结合蛋白为单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,该单克隆抗体或其片段为小鼠的、嵌合的、人源化的或完全是人的。在一个实施方案中,该单克隆抗体或其片段结合至BLys或IL-13。

[0081] 在一方面,所述制剂包含抗原结合蛋白、组氨酸、精氨酸、NaCl和聚山梨醇酯80。在另一方面,所述制剂包含:约200mg/mL的抗原结合蛋白、约10mM的组氨酸、约25mM的精氨酸、约115mM NaCl和约0.01%的聚山梨醇酯80,pH约6.0。在一个实施方案中,该抗原结合蛋白结合至BLys。

[0082] 在一个实施方案中,本发明的药物制剂提供了:约200mg/mL的抗原结合蛋白;约15mM的组氨酸,pH为约6.25;约150mM的NaCl;约0.02% (w/v) 聚山梨醇酯80;和约0.05mM EDTA。在一个实施方案中,该抗原结合蛋白结合至IL-13。

[0083] 在一方面,本发明的药物制剂在冷冻和解冻(freezing and thawing)期间稳定。”稳定的”制剂为这样的制剂,其中几乎所有蛋白在预期储存温度(例如2-8℃)下储存时保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性。期望该制剂在储存时基本保持其物理和化学稳定性以及其生物活性。通常根据制剂的预期贮存期限选择其储存时间。此外,该制剂应在对制剂进行冷冻(例如至-70℃.)和融后稳定,例如在1、2或3个冷冻-解冻循环后稳定。本领域存在测量蛋白稳定性的多种分析技术,其在以下文献中被综述,例如:Peptide and Protein Drug Delivery,247-301;Vincent Lee Ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York, N.Y.,Pubs.(1991);和Jones,A.Adv.Drug Delivery Rev.10:29-90(1993)。可在选定的温

度选定的时间段内测量稳定性。可以不同方式定性和/或定量地评估稳定性,包括:评估聚集的形成(例如使用尺寸排阻色谱、通过测量混浊度和/或通过肉眼检查);通过使用阳离子交换色谱或毛细管区带电泳评估电荷异质性;氨基末端或羧基末端序列分析;质谱分析;为了比较降解的(reduced)和完整的抗体的SDS-PAGE分析;肽谱(例如胰蛋白酶或LYS-C)分析;评估抗体的生物活性或抗原结合功能;等。

[0084] 在一个实施方案中,本发明的药物制剂适于皮下或肌肉内给药。

[0085] 查询(query)氨基酸序列和主题(subject)氨基酸序列之间的“同一性百分比”为,在进行了成对BLASTP比对之后,当主题氨基酸序列与查询氨基酸序列具有100%的查询覆盖(query coverage)时由BLASTP算法计算的“同一性”数值,其被表达为百分比。在查询氨基酸序列和主题氨基酸序列之间使用BLASTP算法的默认设置进行该成对BLASTP比对,上述算法可由国家生物技术中心的网站获得,其中关闭对低复杂性区域的过滤。重要的是,查询氨基酸序列可通过本申请一个或多个权利要求中鉴定的氨基酸序列来描述。

[0086] 查询序列可与主题序列具有100%的同一性,或者相比于主题序列,其可包括至多一定整数数目的氨基酸变化,从而使得同一性百分比(%)小于100%。例如,查询序列与主题序列具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。该变化包括至少一个氨基酸的缺失、取代(包括保守和非保守的取代)或插入,并且其中所述变化可发生在查询序列的氨基或羧基末端的位置,或者可发生在这些末端位置之间的任何位置,上述变化或者独立地分散在查询序列的氨基酸之中,或者以一个或多个连续的组形式分散于查询序列内。

[0087] 可在查询序列(包括CDR)的整个长度内确定同一性%。或者,该同一性%可以不包括CDR,例如,CDR与主题序列具有100%同一性,且同一性%变化存在于查询序列的剩余部分中,因此该CDR序列是不变的/完整的。

[0088] 在一个实施方案中,抗原结合蛋白为单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,单克隆抗体或其片段为小鼠的、嵌合的、人源化的或者完全是人的。在一个实施方案中,单克隆抗体或其片段结合至BLyS (SEQ ID NO:1)或BLyS的异源三聚体或同源三聚体形式、例如,单克隆抗体或其片段结合至BLyS的可溶形式(SEQ ID NO:10)。在一个实施方案中,单克隆抗体包含重链和轻链可变区,该重链和轻链可变区分别包含:与SEQ ID NO:2具有90%的同一性、或91%的同一性、或92%的同一性、或93%的同一性、或94%的同一性、或95%的同一性、或96%的同一性、或97%的同一性、或98%的同一性、或99%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:3具有90%的同一性、或91%的同一性、或92%的同一性、或93%的同一性、或94%的、或95%的同一性、或96%的同一性、或97%的同一性、或98%的同一性、或99%的同一性的氨基酸序列,或者该重链和轻链可变区分别包含:与SEQ ID NO:4具有90%的同一性、或91%的同一性、或92%的同一性、或93%的同一性、或94%的同一性、或95%的同一性、或96%的同一性、或97%的同一性、或98%的同一性、或99%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:5具有90%的同一性、或91%的同一性、或92%的同一性、或93%的同一性、或94%的同一性、或95%的同一性、或96%的同一性、或97%的同一性、或98%的同一性、或99%的同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,单克隆抗体包含重链和轻链可变区,该重链和轻链可变区分别包含与SEQ ID NO:2具有95%的同一性的氨基酸序列和与SEQ ID NO:3具有95%的同一性的氨基酸序列,或者该重链和轻链可变区分别包含与SEQ ID NO:4具有

95%的同一性的氨基酸序列和与SEQ ID NO:5具有95%的同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,单克隆抗体包含重链和轻链可变区,该重链和轻链可变区分别包含与SEQ ID NO:2具有90%的同一性的氨基酸序列和与SEQ ID NO:3具有90%的同一性的氨基酸序列,或者该重链和轻链可变区分别包含与SEQ ID NO:4具有90%的同一性的氨基酸序列和与SEQ ID NO:5具有90%的同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,单克隆抗体包含重链和轻链可变区,该重链和轻链可变区分别包含SEQ ID NO:2和3所示的氨基酸序列,或者分别包含SEQ ID NO:4和5所示的氨基酸序列。在一个实施方案中,单克隆抗体包含重链和轻链,该重链和轻链分别包含:与SEQ ID NO:6具有90%的同一性、或91%的同一性、或92%的同一性、或93%的同一性、或94%的同一性、或95%的同一性、或96%的同一性、或97%的同一性、或98%的同一性、或99%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:7具有90%的同一性、或91%的同一性、或92%的同一性、或93%的同一性、或94%的同一性、或95%的同一性、或96%的同一性、或97%的同一性、或98%的同一性、或99%的同一性的氨基酸序列,或者该重链和轻链分别包含:与SEQ ID NO:8具有90%的同一性、或91%的同一性、或92%的同一性、或93%的同一性、或94%的同一性、或95%的同一性、或96%的同一性、或97%的同一性、或98%的同一性、或99%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:9具有90%的同一性、或91%的同一性、或92%的同一性、或93%的同一性、或94%的同一性、或95%的同一性、或96%的同一性、或97%的同一性、或98%的同一性、或99%的同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,单克隆抗体包含重链和轻链,该重链和轻链分别包含与SEQ ID NO:6具有95%的同一性的氨基酸序列和与SEQ ID NO:7具有95%的同一性的氨基酸序列,或者分别包含与SEQ ID NO:8具有95%的同一性的氨基酸序列和与SEQ ID NO:9具有95%的同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,单克隆抗体包含重链和轻链,该重链和轻链分别包含与SEQ ID NO:6具有90%的同一性的氨基酸序列和与SEQ ID NO:7具有90%的同一性的氨基酸序列,或者分别包含与SEQ ID NO:8具有90%的同一性的氨基酸序列和与SEQ ID NO:9具有90%的同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,单克隆抗体包含重链和轻链,该重链和轻链分别包含SEQ ID NO:6和7所示的氨基酸序列,或者分别包含SEQ ID NO:8和9所示的氨基酸序列。在一个实施方案中,单克隆抗体包含CDR,所述CDR包含SEQ ID NO:11、12、13、14、15和16中所示的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗-BLyS抗体选自:贝利单抗、tabalumab及其混合物。在一个实施方案中,抗-BLyS抗体包含分别在SEQ ID NO:6和7中所示的重链和轻链序列。

[0089] 在一个实施方案中,本发明的药物制剂包含的单克隆抗体浓度为 $200 \pm 20\text{mg/mL}$ 。在一个实施方案中,所述抗体浓度为约 200mg/mL 。在一个实施方案中,抗-BLyS抗体与皮质类固醇相伴或相继共同给药。在一个实施方案中,该皮质类固醇选自泼尼松、泼尼松龙、氢化可的松、甲基泼尼松龙和地塞米松。在一个实施方案中,该皮质类固醇为泼尼松。

[0090] 在一方面,本发明提供了前述的药物制剂,其用于治疗对用抗-BLyS抗体进行的治疗具有顺应性的疾病或障碍。在一个实施方案中,本发明涉及治疗受试者中的疾病或病症的方法,所述疾病或病症对抗-BLyS抗体的治疗具有顺应性,该方法包括以对治疗所述疾病或病症有效的量在受试者中给药本发明的制剂。在一个实施方案中,所述疾病或病症选自系统性红斑狼疮、抗嗜中性白细胞胞质抗体(“ANCA”)血管炎、狼疮性肾炎、原发性舍格伦综合征、慢性免疫性血小板减少症、重症肌无力、症状性瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、等待肾

移植的患者的免疫脱敏、膜性肾病、系统性硬化病、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、多发性硬化和肾衰竭。在另一个实施方案中,所述疾病或病症为系统性红斑狼疮。在另一方面,本发明提供了用于治疗选自以下疾病的制剂:系统性红斑狼疮、抗嗜中性白细胞胞质抗体(“ANCA”)血管炎、狼疮性肾炎、原发性舍格伦综合征、慢性免疫性血小板减少症、重症肌无力、症状性瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、等待肾移植的患者的免疫脱敏、膜性肾病、系统性硬化病、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、多发性硬化和肾衰竭。在另一方面,本发明提供了用于治疗系统性红斑狼疮的制剂。在另一方面,本发明提供了制剂在制备用于治疗疾病的药物中的用途,所述疾病选自:系统性红斑狼疮、抗嗜中性白细胞胞质抗体(“ANCA”)血管炎、狼疮性肾炎、原发性舍格伦综合征、慢性免疫性血小板减少症、重症肌无力、症状性瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、等待肾移植的患者的免疫脱敏、膜性肾病、系统性硬化病、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、多发性硬化和肾衰竭。在另一方面,本发明提供了制剂在制备用于治疗系统性红斑狼疮的药物中的用途。

[0091] 在一方面,本发明提供了试剂盒,其包含:一个或多个含有本发明的制剂的小瓶;和用于向患者皮下给药所述制剂的说明书。在一个实施方案中,该试剂盒进一步包含用于向患者皮下给药所述制剂的注射装置。

[0092] 在一个实施方案中,本发明涉及包含本申请所述的稳定的抗-BLyS抗体制剂的注射装置。对于皮下递送,该制剂可通过合适的装置给药,所述装置例如(但不限于):注射器;注射装置(例如INJECT-EASE™和GENJECT™装置);输注泵(例如Accu-Chek™);注射笔(例如GENPEN™);或无针装置(例如MEDDECTOR™和BIOJECTOR™)。

[0093] 本发明的药物制剂基本不含(人眼观察)可见的颗粒。(通过不透光度测量的)不可见颗粒应满足以下标准:每小瓶 $\geq 10\mu\text{m}$ 的颗粒的最大数目 $\rightarrow 6000$;每小瓶 $\geq 25\mu\text{m}$ 的颗粒的最大数目 $\rightarrow 600$ 。

[0094] 本发明的药物活性的抗-BLyS抗体的药物制剂可通过皮下注射给药,其中以1、2、3或4周的时间间隔重复多次给药。在一个实施方案中,药物活性的抗-BLyS抗体的药物制剂被每周给药一次或者每两周给药一次。在多数情况中,在1至10分钟的时间段内给药全部体积的注射流体,优选在2至6分钟内,最优选 3 ± 1 分钟。

[0095] 对于疾病的预防或治疗,抗体的合适剂量取决于以下因素:将被治疗的疾病类型(如上所定义);疾病的严重性和病程;抗体是为了预防目的还是治疗目的而给药;之前的治疗;患者的临床病史以及其对抗体的响应;和主治医师的判断。该抗体适合向患者一次给药,或者在一系列治疗期间给药。根据疾病的类型或严重性,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重(或更具体地,约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 体重至 $20\text{mg}/\text{kg}$ 体重)的抗体为用于向患者给药的备选起始剂量,无论是,例如,通过一次或多次的单独给药,或通过连续输注。更具体地,抗体的剂量范围在每 kg 体重约 0.05mg 的抗体至每 kg 体重约 10mg 的抗体内。

[0096] 在本发明的另一个实施方案中,提供了一种制品,其含有本发明的药物制剂并提供关于其使用说明书。该制品包含容器。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶(例如多室或双室的小瓶)、注射器(例如多室或双室的注射器)和试管。该容器可由多种材料形成,如玻璃或塑料。该容器容纳所述制剂,并且在该容器上或与该容器相连的标签上可标明使用说明。容纳所述制剂的容器可为多用途小瓶,其允许经重构的制剂的重复给药(例如2至6次给药)。该制品可进一步包括从商业和使用者的立场来看所期望的其它物质,包括其它缓冲

剂、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有使用说明书的包装说明书。

[0097] 根据本发明配制的抗体优选为基本纯的,并期望为基本同质的。“基本纯的”抗体是指,基于组合物的总重量,该组合物包含至少约90%重量的抗体,优选至少约95%重量。“基本同质的”抗体是指,基于组合物的总重量,该组合物包含至少约99%重量的抗体。

[0098] 通过引用以下实施例,本发明将被更完全地理解。然而这些实施例仅仅是示例性的并且不应被理解为限制本发明的范围。操作上的微小变化,例如时间、温度、量、浓度、规模等方面的微小变化预期不会影响所述实验的结果。所有文献和专利的引用被引入本申请中作为参考。

[0099] 通过所附图1-20对实施例进行进一步说明。

实施例

[0100] 实施例1:贝利单抗制剂

[0101] 容器封装

[0102] 除非另外提及,否则所有研究均使用带有Daikyo D21-7SFlurotec®塞子和易拉铝密封的I型Schott小瓶。建议将该小瓶和塞子的组合作为第1期的配置。使用Gerresheimer 1.0mL长、29G、薄壁、支柱式(staked)、预填充的注射器(其具有Stelmi 4800针罩和Daikyo W4023Flurotec®活塞)将长期稳定性样品储存于>2-8℃,并将其抽空冲入氮气。在<2-8℃将样品填充到低温小瓶中。

[0103] 产品处理程序

[0104] 在所有实验之前,使用0.22μm的过滤器将贝利单抗无菌过滤,并将其无菌地填入所选的容器封装中。在储存期间使所有稳定性样品避光。

[0105] 赋形剂的选择

[0106] 在筛选研究中,当可能的时候,使用GMP BDS规定且由FDP制造的多种药典级(multi-compendial)赋形剂,并将其用于所有制剂的长期稳定性研究中。

[0107] 表2提供了所测试的制剂列表。

[0108] 表2

[0109]

编号	制剂说明		
	缓冲剂浓度(mM)	稳定性赋形剂浓度(mM)	pH
1	10 mM 组氨酸	140 mM NaCl	6.0
2	10 mM 组氨酸	280 mM 蔗糖	6.0
3	10 mM 组氨酸	140 mM 蔗糖, 70 mM NaCl	6.0
4	10 mM 组氨酸	5.4 mM MgCl ₂ , 130 mM NaCl	6.0
5	10 mM 组氨酸	25 mM 精氨酸, 115 mM NaCl	6.0
6	10 mM 组氨酸	280 mM 山梨糖醇	6.0
7	10 mM 组氨酸	25 mM 精氨酸, 5.4 mM MgCl ₂ , 105 mM NaCl	6.0
8	10 mM 琥珀酸盐	140 mM NaCl	6.0

[0110] 长期稳定性

[0111] 制剂1中的依赖于浓度的聚集作用

[0112] 如同预期的一样,聚集作用随着蛋白质浓度的增加而增加(表3,图1)。在100mg/mL至260mg/mL,聚集速率大致翻了一倍,但相比于200mg/mL的贝利单抗,即使在260mg/mL时,在2-8℃储存3年期间,聚集仅增加了约1%。注意到,通过SEC-HPLC观察到的聚集的起始量随蛋白质浓度的增加而增加,虽然仅增加约0.1%(表3中0个月那一行)。

[0113] 表3蛋白质浓度对聚集%的影响

月份	100 mg/mL	140 mg/mL	180 mg/mL	220 mg/mL	260 mg/mL
0	0.47%	0.50%	0.54%	0.58%	0.60%
1	0.47%	0.51%	0.52%	0.58%	0.62%
2	0.54%	0.61%	0.64%	0.75%	0.78%
4	0.53%	0.59%	0.63%	0.72%	0.77%
6	0.58%	0.63%	0.70%	0.76%	0.84%
率/月	0.018%	0.021%	0.027%	0.030%	0.040%

[0115] 备选的长期制剂的筛选

[0116] 基于以下结果,在评估了3个月的数据之后,将备选制剂缩窄至制剂1和5,然后在5¹/₄个月后选择制剂5作为最终制剂。

[0117] 外观、pH和渗透压

[0118] 在长达5¹/₄个月的所有时间点,所有样品为乳光状(opalescent)、淡黄色且不含可见颗粒物。当以比色法在最初的时间点测试时,在全部3种浓度下的所有8种制剂中的最终药品均最接近Y5颜色标准。在2-8℃储存3个月和5¹/₄个月后,在组氨酸/NaCl(在本申请中称作制剂1)和组氨酸/NaCl/精氨酸(在本申请中称作制剂5)制剂中的所有FDP样品也符合Y5标准。含有糖稳定剂(蔗糖和山梨糖醇)的样品的混浊度显著低于其它所有样品,其在最初时间点和3个月的时间点在29-38NTU的范围内。在含NaCl的样品中,混浊度也随着蛋白质浓度的降低而增加。在2-8℃储存5¹/₄个月后,仅测试了制剂1和5,且其没有显示对制剂、浓度或时间的任何反应(图2)。

[0119] 表4在2-8℃储存3个月后的长期稳定性样品的混浊度

[0120]

	混浊度 (NTU)					
	高浓度 (~200 mg/mL)		中等浓度 (~165 mg/mL)		低浓度 (~125 mg/mL)	
	0 个月	3 个月	0 个月	3 个月	0 个月	3 个月
组氨酸/NaCl (制剂 1)	33	33	37	37	37	37
组氨酸/蔗糖 (2)	25	23	24	24	22	23
组氨酸/蔗糖/NaCl (3)	30	30	33	33	34	35
组氨酸/NaCl/MgCl ₂ (4)	31	31	35	36	36	37
组氨酸/NaCl/精氨酸 (制剂 5)	29	28	33	33	33	34
组氨酸/山梨糖醇 (6)	27	27	24	26	26	26
组氨酸/NaCl/精氨酸/MgCl ₂ (7)	29	29	32	31	32	33
琥珀酸盐/NaCl (8)	31	31	36	35	36	37

[0121] 在起始时间点,所有样品的pH范围在6.1至6.3,且在5¹/₄个月后,制剂1和5的pH没有变化(制剂5的数据显示在表13中)。仅在起始时间点测试了渗透压;所有样品均为299+/-17mOsm/kg。

[0122] 粘度和可注射性

[0123] 含糖(蔗糖、山梨糖醇)制剂显示出最高粘度,随后是琥珀酸盐/氯化钠制剂(表5)。其余含盐样品粘度相当。在制剂1和5中,粘度随蛋白质浓度的增加呈指数性增加(图3)。

[0124] 表5在T0时长期稳定性样品的粘度

[0125]

样品	粘度 (mm ² /s)		
	高浓度 (~200 mg/mL)	中等浓度 (~165 mg/mL)	低浓度 (~125 mg/mL)
组氨酸/NaCl (制剂 1)	10.2	5.8	3.6
组氨酸/蔗糖	17.4	7.7	4.9
组氨酸/蔗糖/NaCl	13.4	7.9	3.9
组氨酸/NaCl/MgCl ₂	12.8	5.6	3.4
组氨酸/NaCl/精氨酸 (制剂 5)	13.0	5.8	3.8
组氨酸/山梨糖醇	21.0	7.6	4.3
组氨酸/NaCl/精氨酸/MgCl ₂	12.8	5.6	3.5
琥珀酸盐/NaCl	15.3	6.6	3.8

[0126] 可注射性被测量为在10秒钟内通过薄壁29G针头递送1mL所需的力,可注射性在起始时间点显示了相似的趋势。在5¹/₄个月后,仅测试了制剂1和5,且在2-8℃没有观察到可注射性随时间的显著增加。在5¹/₄个月的时间点,还在各个注射器上检测了20秒内的可注射性,并且显示,当递送时间加倍时,递送力降低了高达40%。尽管没有测试,但也可通过增加

针头规格来降低递送力。

[0127] 表6在T0和5¹/₄个月的长期稳定性样品的可注射性

[0128]

样品和递送时间	样品	可注射性 (N)		
		高浓度 (~200 mg/mL)	中等浓度 (~165 mg/mL)	低浓度 (~125 mg/mL)
起始时间点 10 秒递送	组氨酸/NaCl (制剂 1)	21.9	14.5	12.0
	组氨酸/蔗糖	31.3	18.2	13.8
	组氨酸/蔗糖/NaCl	25.7	17.5	12.7
	组氨酸/NaCl/MgCl ₂	23.8	14.1	11.1
	组氨酸/NaCl/精氨酸 (制 剂 5)	24.4	16.3	11.5
	组氨酸/山梨糖醇	35.7	18.0	12.6
	组氨酸/NaCl/精氨酸 /MgCl ₂	25.0	16.1	10.9
	琥珀酸盐/NaCl	28.3	14.6	11.7
5¼个月、2-8°C 样品 10 秒递送	组氨酸/NaCl (制剂 1)	24.4	16.1	10.6
	组氨酸/NaCl/精氨酸 (制剂 5)	24.2	16.7	10.8
5¼个月、2-8°C 样品 20 秒递送	组氨酸/NaCl (制剂 1)	14.4	10.0	9.4
	组氨酸/NaCl/精氨酸 (制剂 5)	16.2	11.1	6.4

[0129] 通过七种市售的笔式注射器 (其与预填充的注射器更相似, 因为它们都需要人工驱动力) 施用药物所需要的力与用于200mg/mL的贝利单抗所需的力相似 (表7)。注射时间因不同的体积和容器直径而变化, 其被列于表7中作为比较。最后, 由英国贸易与工业部委托的诺丁汉大学的研究显示, 在坐下时, 年龄在16岁至90岁之间的59名女性能够以其拇指在臀部水平处施加53.7至237.7N向下的静止力。尽管无论是笔式注射器的数据还是关于力的研究都与使用预填充的注射器不完全相关, 但这两种数据都确认了, 对于200mg/mL贝利单抗的粘度和可注射性来说, 手动给药是可行的。从1mL长的预填充注射器经由29G薄壁针头递送200mg/mL贝利单抗所需的力达到或接近手动注射可期望的极限, 因此优选的是更粗的针头。

[0130] 表7市售笔式注射器 (Pen) 在80mm/min时的注射力

[0131]

笔式注射器	提供的针头	公司	适应症	注射力 (N)	递送时间 (秒)
Gonal-f RFF	Ypsomed Penfine 29Gx1/2"	EMD Serono	不孕	22.3	5.3
Lantus SoloStar	无 (推荐 BD)	Sanofi-Aventis	2 型或 I 型 糖尿病	6.4*	11.3
Lantus SoloStar	BD Microfine 30Gx8mm	Schering Corporation	慢性丙型 肝炎	21.1	7.1
Lantus SoloStar	无 (推荐 BD)	Eli Lilly	糖尿病	24.9*	7.1
Lantus SoloStar	无(推荐 29、30、 31G)	Amylin Pharmaceuticals Eli Lilly	2 型糖尿病	13.4*	4.1
Lantus SoloStar	无(推荐 Novofine)	Novo Nordisk	GH 治疗	13.8*	9.4
Lantus SoloStar	无 (推荐 BD)	Eli Lilly	骨质疏松	24.1*	5.3

[0132] *使用Ypsomed Penfine 29Gx12.7mm针头递送

[0133] 大小变体

[0134] 3个月的SEC-HPLC数据

[0135] 对于所有制剂中的贝利单抗,通过SEC-HPLC所见的聚集作用是主要的浓度依赖性路径。碎裂百分比(观察为后肩峰(back shoulder))可在0.1%至0.2%之间变化,但不随时间变化(获得5¹/₄个月的数据的支持)。

[0136] 在2-8℃保存3个月后,针对配制于8种制剂中的贝利单抗观察到聚集速率上的显著差异(图4)。制剂5(组氨酸/NaCl/精氨酸)在3个月期间显示最低的速率,尤其是在200mg/mL时(图4中蓝色)。这得到了在200mg/mL时的加速趋势的支持(图5)。琥珀酸盐在低温时为最差的稳定剂,但在升高的温度时为最佳。其它盐和糖的制剂中的多种(包括制剂1(组氨酸/NaCl))显示类似的绝对聚集百分比和聚集速率。

[0137] 5¹/₄个月的SEC-HPLC数据

[0138] 在5¹/₄个月时对制剂1和5中的贝利单抗进行评估。在3个月时观察到的趋势仍然在继续,其中含精氨酸的制剂显示出较低的聚集速率,尤其是在200mg/mL的最高浓度时。图6显示了在高达25℃储存5¹/₄个月后的聚集速率,并显示,相比于制剂1(实心方块),精氨酸制剂(图中的空心方块)显著降低聚集作用。图7中在不同温度时对聚集速率的进一步分析显示,制剂5(虚线)始终一致地显示比制剂1(实线)更低的聚集速率。如果在长达5¹/₄个月内观察到的2-8℃聚集速率保持3年,则FDP将仅增加约1.2%。

[0139] CGE

[0140] 在不同温度下储存5¹/₄个月,制剂1和5的毛细管凝胶电泳没有显示出减少的趋势(速率示于图8中)。因此,交联和剪切(clipping)并不依赖于浓度或制剂。

[0141] 电荷异质性

[0142] 离子交换表明,浓度或向组氨酸缓冲盐制剂中加入精氨酸均不会影响电荷变化(图9)。尽管酸性变体在升高的温度下随时间增加,但在5¹/₄个月后观察到很少的变体变化或没有观察到变体变化。

[0143] 氧化

[0144] 在2-8℃储存3个月后,在任何该8种制剂中没有观察到氧化方面的显著变化(数据未显示)。在5¹/₄个月后,当比较-80℃和15℃的数据时,在制剂1和5之间或在任一种制剂的三种浓度之间没有观察到氧化方面的差异(图10)。在25℃储存5¹/₄个月后,在所有样品中观察到约1.0%的额外的氧化,并且在40℃观察到约4.5%的额外的氧化。

[0145] 肽谱

[0146] 在5¹/₄个月后,在200mg/mL制剂1的-80℃和2-8℃样品或对照标准品之间没有观察到差异(图11)。如预期的那样,在升高的温度时,25℃样品在T4去酰胺作用方面显示少量的增加。制剂5样品仅在25℃类似地显示出T4去酰胺作用,但也在一些其它肽峰中显示出不一致的峰高(图12中,重链的T33、T34和T5,轻链的T3)。这些峰高没有随温度变化的趋势,因此怀疑是精氨酸的消化干扰。

[0147] 为了确定精氨酸干扰是否是该变化的原因,向制剂1样品(已经对该样品进行过本方法的脱盐步骤)中加入0mM、25mM和50mM的精氨酸。然后对所有三种样品进行其余的步骤,其中包括胰蛋白酶消化。在稳定性样品中显示出变化的相同的肽峰显示出与精氨酸浓度相关的响应(图13)。这表明脱盐步骤并不总能完全清除精氨酸,并且解释了在制剂5的样品的肽谱中观察到的变化与温度无关。由于没有在肽谱中观察到任何其它改变,因此可认为,尽管谱中存在差异,但制剂1和5在2-8℃储存5¹/₄个月后并无可观测到的降解,且仅在25℃储存5¹/₄个月后具有最少的降解。

[0148] 效力

[0149] 125mg/mL至200mg/mL之间的制剂1或制剂5在2-8℃储存3个月后,或200mg/mL的制剂5在2-8℃在储存5¹/₄个月后,贝利单抗仍保持生物活性(表8)。

[0150] 表8在2-8℃稳定性测试后的相对效力

	相对效力%	
	3 个月	5 ¹ / ₄ 个月
[0151]	200 mg/mL 制剂 5	102%
	125 mg/mL 制剂 5	118%
	200 mg/mL 制剂 1	106%
	125 mg/mL 制剂 1	90%

[0152] 冷冻/解冻的评估

[0153] 被暴露于5次在-40℃至2-8℃之间的快速冷冻/解冻循环的样品与-40℃的对照样品具有相似的聚集量,表明无论是在制剂1或制剂5中,快速冷冻/解冻都不是问题(表9)。

[0154] 表9暴露于快速冷冻/解冻的贝利单抗的SEC-HPLC结果

	聚集%	
	制剂 1	制剂 5
[0155]	2-8°C 对照	0.6
	-20°C 对照	0.8
	-40°C 对照	0.6
	-80°C 对照	0.6
	-40/2-8°C 5 次循环	0.7

[0156] 相比于液体对照,被暴露于3次慢速冷冻/解冻循环的样品显示,聚集水平增加了0.2% (表10)。

[0157] 表10暴露于慢速冷冻/解冻的贝利单抗的SEC-HPLC结果

样品	聚集%	主峰%	剪切%
制剂 1 液体对照	0.7	99.1	0.2
[0158] 制剂 1 慢速冷冻/解冻	0.9	98.9	0.2
制剂 5 液体对照	0.6	99.2	0.1
制剂 5 慢速冷冻/解冻	0.8	99.1	0.2

[0159] DSC

[0160] 使用量热法评估各制剂冷冻点以下的玻璃转化 (T_g') 并确定是否形成冷冻点以下的共晶体 (eutectic)。可在低于约-21°C时形成氯化钠-水的共晶,并且赋形剂的共晶结晶可通过引入晶体表面相互作用以及改变含有蛋白的冷冻浓缩物中的局部化学环境,而影响产品质量。在低于 T_g' 的温度储存可通过增加弛豫时间以及减少相关降解而改善稳定性。

[0161] 就冷冻点以下的转化而言,高浓度贝利单抗的制剂1和5具有相似的行为 (表11)。对于制剂1, T_g' 在-23°C (最快冷冻) 至-33°C (最慢冷冻) 的范围内。对于制剂5, T_g' 在-22°C (最快冷冻) 至-32°C (最慢冷冻) 的范围内。对于这两种制剂,仅在进行具有-23°C多次退火步骤的热循环后才观察到共晶吸热。该共晶最可能是氯化钠-水。

[0162] 这些结果表明,这些制剂在冷冻点以下的热转化对于样品的热历史 (thermal history) 很敏感。这是由于高度溶解的固体含量以及氯化钠的存在,其会影响蛋白/无定型相中的 T_g' 。这些结果与5.2节中在-80°C和-40°C的稳定性数据结合,还表明<-40°C以及避光的BDS储存对于制剂5中的贝利单抗来说已经足够。

[0163] 表11制剂5&制剂1中贝利单抗的DSC结果

[0164]

样品		制剂 1:	制剂 5:
快速冷冻	样品质量 (mg)	16.5	16.5
	Tg'	-23°C	-22°C
	共晶吸热	未观察到共晶	未观察到共晶
中速冷冻至 -40°C 退火	样品质量 (mg)	15.7	16.7
	Tg'	-27°C	-26°C
	共晶吸热	未观察到共晶	未观察到共晶
中速冷冻至 -23°C 退火	样品质量 (mg)	16.9	16.3
	Tg'	-25°C	-27°C
	共晶吸热	未观察到共晶	未观察到共晶
慢速冷冻至 -60°C	样品质量 (mg)	17.7	16.3
	Tg'	弱-33°C	弱-32°C
	共晶吸热	未观察到共晶	未观察到共晶
热循环 (-80/-23°C, 具有退火)	样品质量 (mg)	15.3	18.6
	Tg'	循环后, 弱-31°C	循环后, 弱-28°C 和-18°C
	共晶吸热	-16°C 至-12°C (0.6 J/g)	-16°C 至-12°C (0.7 J/g)

[0165] 振荡评估

[0166] 在以250rpm振荡48小时后,在所研究的聚山梨醇酯浓度范围内,无论是在小瓶或是在注射器中,都没有观察到纯度(通过SEC-HPLC测量)或混浊度的明显变化(表12)。在小瓶和注射器中,均显示0.01%聚山梨醇酯80在制剂5中是有效且稳健的抗振荡保护剂。

[0167] 表12以250rpm振荡后,制剂5中贝利单抗的SEC-HPLC和混浊度

[0168]

		通过 SEC 测量的主峰 %			混浊度 (NTU)	
容器封装	样品	0 小时	24 小时	48 小时	0 小时	48 小时
小瓶	对照(无振荡)	99.4	99.3	99.3	37	38
	低 PS80 (0.005%)	99.4	99.3	99.3	35	35
	目标 PS80 (0.01%)	99.4	99.3	99.3	33	37
	高 PS80 (0.02%)	99.4	99.4	99.4	30	33

[0169]

注射器	对照(无振荡)	99.4	99.3	99.3	37	38
	低 PS80 (0.005%)	99.4	99.3	99.3	35	35
	目标 PS80 (0.01%)	99.4	99.3	99.3	33	34
	高 PS80 (0.02%)	99.4	99.3	99.4	30	32

[0170] 结论

[0171] 根据使得主要降解途径速率最小化的能力,选择了200mg/mL贝利单抗的皮下给药制剂(制剂5;0.65mg/mL L-组氨酸,1.2mg/mL L-组氨酸单盐酸盐,6.7-7.3mg/mL氯化钠,5.3mg/mL L-精氨酸盐酸盐,0.1mg/mL聚山梨醇酯80,pH 6.0;或者,10mM组氨酸,115mM氯化钠,25mM L-精氨酸盐酸盐,0.01% (w/v) 聚山梨醇酯80,pH 6.0)。聚集速率(~0.03%/月,2-8℃)随贝利单抗浓度的增加而增加,但被使用25mM精氨酸抑制。在2-8℃,去酰胺的速率约为0.2%/月。对于使用1mL长的注射器和29G薄壁或更粗的针头进行手动或自动注射器的递送而言,200mg/mL制剂具有可接受的递送力。已显示,冷冻/解冻性质以及在-80℃和-40℃的储存是可接受的,并且产品不易受振荡应力的影响。

[0172] 在贝利单抗最终药物产品为200mg/mL的制剂5(向1mL长的BD注射器中填充1.0mL)中进行了长期GMP稳定性研究。目前具有在预期储存温度2-8℃42个月的GMP稳定性数据(表14)。该结果表明,制剂5为贝利单抗提供了足够的稳定性,且在预期储存温度2-8℃观察到了可接受的降解曲线(表14)。

[0173]

表 13. 制剂 5 中 200 mg/mL 贝利单抗的长期稳定性

时间 (月)	温度 (°C)	外观	比色测定	pH	混浊度 (NTU)	SEC 聚集%	SEC 纯度 %	SEC 片段%	IEC 酸性 物%	IEC 主峰 %	IEC 碱性 有肩峰	IEC 碱性物 (无肩峰)	RP % HC 氧化	CGE % 纯度	效力 (相 对结合%)
0	NA	OPF	Y5	6.3	29	0.6	99.2	0.2	12.9	78.5	5.2	8.6	1.8	95.0	
	-80			6.2		0.6	99.4	0	12.6	79.4	5.0	8.0	3.8	93.1	102
	-40			6.2		0.6	99.3	0.1	12.7	79.6	4.8	7.7	3.8	93.8	
	5	OPF	Y5	6.3	29	0.7	99.1	0.2	13.0	79.3	4.9	7.7	2.2	92.4	105
3	15		Y5	6.3		1.0	98.8	0.2	15.6	76.9	4.6	7.5	4.1	95.7	
	25		Y5	6.1		1.2	98.5	0.4	25.7	68.1	3.9	6.2	4.6	93.2	
	-80			6.2		0.6	99.4	0.0	13.9	78.2	4.7	7.9	2.1	94.7	
	-40			6.2		0.7	99.3	0.0	12.2	78.9	5.6	9.0	2.0	95.6	
5.25	5	OPF	Y5	6.2	37	0.7	99.2	0.1	12.9	78.2	5.1	8.8	2.3	94.3	118
	15			6.2		1.0	98.8	0.1	18.1	73.1	5.5	8.8	2.4	92.8	
	25			6.2		1.4	98.2	0.4	34.2	58.5	4.1	7.3	3.3	93.1	
	40			6.2		9.7	88.1	2.2	92.9	2.2	3.3	4.8	6.4	83.7	
9	5	OPF	Y5			0.9	99.1	0.1	14.6	78.3	4.2	7.2	2.6	96.4	

[0174]

表 14. 制剂 5 中 200 mg/mL 贝利单抗在预期储存温度 2-8°C 时的 GMP 稳定性数据(在 1 mL 长的 BD 注射器中填充 1.0 mL)

测试 (分析方法)	临床验收标准	时间(月)											
		0	1	2	3	6	9	12	18	24	30	36	42
外观[肉眼检查 (Ph. Eur. 2.2.1 和 2.2.2)]	澄清至乳光状, 无 色至浅黄色溶液, 基本无外源性颗粒 物质	OPF	OPF	OPF	OPF	OPF	OPF	OPF	OPF	OPF	OPF	OPF	OPF
电荷异质性 (IE-HPLC)	主峰(MP): 64.3%-89.7% 酸性峰(AP): 报告 结果(X.X%)	MP: 75.6 AP: 13.2	MP: 75.3 AP: 13.4	MP: 74.9 AP: 13.6	MP: 74.7 AP: 14.1	MP: 75.0 AP: 14.1	MP: 74.1 AP: 14.9	MP: 72.0 AP: 16.3	MP: 72.3 AP: 16.2	MP: 70.7 AP: 17.7	MP: 69.4 AP: 19.3	MP: 69.2 AP: 20.1	MP: 68.3 AP: 20.8
容器密封完整性 (染料泄漏)	通过							通过		通过	通过	通过	通过
可递送体积 (USP <1>, Ph. Eur. 2.9.17)	1.0-1.1 mL 最大体积: X.XX mL 最小体积: X.XX mL	最大: 1.06 最小: 1.04	最大: 1.06 最小: 1.05	最大: 1.06 最小: 1.05	最大: 1.06 最小: 1.05	最大: 1.08 最小: 1.05	最大: 1.07 最小: 1.05	最大: 1.06 最小: 1.05	最大: 1.06 最小: 1.05	最大: 1.06 最小: 1.05	最大: 1.06 最小: 1.05	最大: 1.06 最小: 1.04	最大: 1.07 最小: 1.05
注射力(压缩力 测试台)	最大爆发力 (break loose Force): 报告 结果(X.X N) 最大峰值挤出力: 报告结果(X.X N)	BLF: 7.7 PEF: 7.4	BLF: 7.0 PEF: 9.1	BLF: 7.8 PEF: 8.1	BLF: 7.1 PEF: 8.6	BLF: 7.5 PEF: 7.5	BLF: 7.1 PEF: 7.2	BLF: 8.0 PEF: 7.6	BLF: 8.1 PEF: 9.2	BLF: 7.3 PEF: 9.3	BLF: 6.8 PEF: 7.5	BLF: 8.4 PEF: 9.9	BLF: 9.5 PEF: 8.4
pH [pH 电极 (USP <791>, Ph. Eur. 2.2.3)]	6.0 +/- 0.4	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.1	6.0	6.0	6.1	6.1
效力(抑制结合)	75%-133%的相对 效力	105	105	96	98	98	99	108	93	105	96	98	98
蛋白质浓度 (A280)	200 +/- 40 mg/mL	200	204	195	202	197	200	198	197	199	197	198	197
纯度	>=95%	99	98	99	98	99	99	99	99	99	99	99	99

高的皮下递送临床剂量 (10mg/kg), 基于PK/PD模型, 需开发小瓶装的200mg/mL浓度的药物和药物产品。作为在小瓶中实现更高浓度的mAb的直接后果, 抗-IL13的各种制剂挑战呈现如下, 例如: (i) 鉴别独特的制剂以支持高浓度的单克隆抗体的稳定性、可制造性、分析和递送挑战, 所述单克隆抗体旨在经由皮下以高临床剂量递送; (ii) 防止因高浓度单克隆抗体的凝胶化所带来的分析和稳定性方面的挑战; (iii) 防止尤其在递送1.5mL以下注射体积的单克隆抗体期间会产生的各种相关挑战。作为在开发制剂期间所揭示的直接发现, 确定了该单克隆抗体具有在升高的温度在特定缓冲系统中形成不可逆的凝胶样基质的趋势, 因此带来了显著的蛋白不稳定的风险。粘度随浓度呈指数增加, 并可使过滤过程变得复杂。较高浓度的单克隆抗体随着颗粒形成以及可逆自缔合风险的增加, 变得更容易聚合。因此, 进行高通量制剂 (HTF) 开发的研究, 以鉴定针对新制剂的最佳缓冲剂和pH, 从而支持用于提供高临床剂量的高浓度单克隆抗体。结合其它实验室研究, 这些研究鉴定了在升高的温度防止凝胶化现象的最佳制剂。其它的制剂开发研究鉴定了待加入到所选择的缓冲系统中的各种赋形剂。将这些进行振荡、冷冻-解冻以及升高温度的研究以评估短期和长期稳定性研究后的物理稳定性, 进而评估抗-IL13mAb的化学稳定性。也进行各种其它研究以确保符合临床递送的考虑。

[0178] 实施例3: HTF pH-缓冲剂的筛选: (鉴定目标pH和缓冲剂)

[0179] 此前测试的基于乙酸盐的50mg/mL的抗-IL13单克隆抗体制剂已证实, 所述pH并非最优化的。欠佳的制剂缓冲pH可通过改变蛋白质上的电荷以及影响静电相互作用而增加较高浓度抗-IL13单克隆抗体溶液的不稳定性。高浓度制剂的开发起始于鉴定最佳pH以及确定最好的缓冲剂种类。

[0180] 该研究是以13mg/mL的mAb浓度进行的。通过在96孔板中的HTF方法进行缓冲剂筛选。该研究由大范围的缓冲剂类型和pH水平组成。各板由48个样品、一式两份按随机顺序组成。将样品在50℃/环境RH下放置3天。该测试包括一般外观 (GA)、A280和A260nm处的浓度、pH、尺寸排阻色谱 (SEC)、毛细管等电聚焦电泳 (cIEF) 和动态光散射 (DLS)。所测试的因素示于表15。

[0181] 表15: HTF缓冲剂筛选研究

[0182]	因素 1 缓冲剂类型 (3 个水平) 10、55 和 100mM	因素 2 pH (6 个水平)
	乙酸盐	4
	乙酸盐、柠檬酸盐	5
	乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐	5.5
	乙酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、琥珀酸盐	6
	乙酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、琥珀酸盐	6.5
	组氨酸、磷酸盐	7

[0183] 对于板的一般外观测试的结果显示, 在一些样品中产生高水平的沉淀, 尤其是在乙酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐的缓冲剂中。琥珀酸盐缓冲剂是唯一一种没有显示沉淀的缓冲剂类型。

[0184] 分别通过cIEF和SEC产生所有样品的去酰胺化和聚集性质。图14为同时显示cIEF

和SEC数据的图。该图显示,通过SEC具有最高单体%的制剂也通过cIEF具有较低的主峰%,这表明抗-IL13在低pH聚集,并在高pH去酰胺化。可观察到,当pH为6-7时的单体%高于pH为4-5.5时的单体%,这与缓冲剂类型无关。

[0185] 整体而言,HTF pH-缓冲剂筛选得出以下结论:(i)通过GA确定,柠檬酸盐和乙酸盐缓冲剂产生最高数目的浑浊孔(表示有沉淀);以及(ii)根据cIEF和SEC结果,磷酸盐缓冲剂促进沉淀,伴随聚集以及去酰胺化的增加;以及(iii)抗-IL13在低pH聚集,并在高pH去酰胺化。

[0186] 实施例4:HTF pH-缓冲剂筛选:(确定最佳pH)

[0187] 基于3X3因素(3种缓冲剂,3个pH)的DOE设计进行第二个HTF研究,其总共由90个样品组成。被选定用来评估的缓冲剂包括乙酸盐、组氨酸和琥珀酸盐,其最终pH的范围在5.5和6.5之间。选择缓冲剂为固定浓度25mM。该设计对每种制剂一式6份进行,同时对在应力板上被用作比较目的的对照组的乙酸盐制剂一式6份进行。

[0188] 将各板在50℃/环境RH下应激放置3天。该测试包括选定样品的一般外观(GA)、A280和A260nm处的浓度、pH、SEC、cIEF、DLS和DSC(差示扫描量热法)。

[0189] 通过被称为Design Expert的统计软件来分析研究结果。当使用相同的软件对所有测试结果进行方差分析(ANOVA)测试时发现了有趣的趋势。发现缓冲剂种类和pH为浓度、校正浓度、DLS、SEC和cIEF的结果的重要因素。

[0190] 图15显示了pH和缓冲剂种类对SEC单体%的相互作用。对于乙酸盐和组氨酸缓冲剂,单体%随pH的增加而增加。图16显示了主峰pH和缓冲剂对cIEF的主峰%的相互作用。发现pH和缓冲剂均为重要因素。由该图可知,5.5-6.5范围内的pH并未显示出影响了乙酸盐或琥珀酸盐的主峰%,但影响了组氨酸的主峰%。

[0191] 总之,HTF pH-缓冲剂的筛选选定了6.25作为最终的最佳pH。

[0192] 实施例5:根据DSC确定的热稳定性性质,确定最佳热应激条件

[0193] 在各种潜在影响蛋白质凝胶化的因素中,如浓度、pH、盐含量,存在一种主导该现象的重要因素-温度。通过DSC来评估由HTF和其它开发研究测试所选择的针对抗-IL13的热稳定性条件。通常,中等大小的球蛋白在大约25℃开始解折叠,而对于单克隆抗体,其在大约60℃开始解折叠。在所有测试的缓冲剂中(乙酸盐、组氨酸和琥珀酸盐),该mAb的解折叠在大约61℃开始,表明其为热稳定的分子,并证实折叠的抗-IL13单克隆抗体可允许50℃加速储存温度。由于在解折叠的起始温度与50℃的加速储存条件之间存在超过10℃的差异,因此决定使用50℃作为用于筛选的储存温度。

[0194] 表16列出了由原始扫描所确定的T_m数值。该T_{m1}值跨越71.3-71.6℃的范围,且T_{m2}值跨越更宽的范围,即83.5-84.1℃。在不同的pH值时,相同缓冲剂的T_m之间不存在显著变化。对于所有条件所测量的T_{m1}和T_{m2}的变化小于1℃,因此所测试的蛋白溶液具有相似的热动力学稳定性。

[0195] 表16:原始扫描所确定的T_m值

[0196]

缓冲剂	T _{m1} , C	T _{m2} , C
乙酸盐6.0	71.3	84.1
乙酸盐6.5	71.4	83.9

组氨酸6.0	69.9	83.6
组氨酸6.5	71.3	84.1
琥珀酸盐6.0	71.4	83.6
琥珀酸盐6.5	71.6	83.5

[0197] 实施例6:评估高浓度制剂的可行性

[0198] 对于>100mg/mL高剂量蛋白质药物的皮下(SC)给药的临床需求通常引入关于制造、分析测试、稳定性和递送方面的额外的技术开发挑战。高浓度蛋白制剂的常见属性为高粘度,这是直接由蛋白的可逆自缔合导致的。由于高注射力(注射位点疼痛的增加),高粘度也可引起额外的临床开发挑战,并还会改变药物的药代动力学性质。因此,产品开发工作的一个重要因素就是寻求鉴定具有低粘度的制剂。可通过改变pH或添加赋形剂来缓解粘度的影响。

[0199] 由于当mAb浓度增加高达200mg/mL时预期粘度以指数形式增加,因此进行了初始可行性研究以调查高浓度抗-IL13溶液的粘度和可注射性。在此前建立的基于乙酸盐的制剂中,将~150mg/mL的溶液浓缩至~210mg/mL。使用锥板流变仪在以下mAb浓度进行粘度测量:50mg/mL、150mg/mL和200mg/mL。

[0200] 图17显示了针对前述浓度作图的不同粘度水平,其中观察到,随着浓度的增加,粘度呈指数形式增加。207.7mg/mL的浓缩溶液的粘度结果为28.6cP。

[0201] 通过将207.7mg/mL的抗-IL13置于装有27规格针头的1mL玻璃注射器中来确定最大注射力,其中注射速度设定为3mm/min,并使用Instron电子机械测试系统来测量。表17显示了在最大浓度207.7mg/mL时获得的粘度和可注射性二者的数值结果。

[0202] 在207.7mg/mL时确定的粘度(28.6厘泊)以及30.3牛顿的最大注射力促使需要付出努力开发额外制剂以允许并实现制造和给药高浓度抗-IL13的可行性。

[0203] 表17:高浓度可行性测定结果的汇总

[0204]

浓度	207.7mg/mL
粘度	28.6厘泊
最大注射力	30.3牛顿

[0205] 实施例7:通过振荡研究评估物理性质

[0206] pH 6.25的组氨酸和琥珀酸盐缓冲剂被鉴定为最佳缓冲系统,然后需要额外的制剂开发研究以鉴定用于高浓度mAb溶液的合适的制剂,该高浓度mAb溶液容易由于高浓度而具有高粘度和易于凝胶化(其作为温度的函数)。

[0207] 在振荡研究中所用的制剂源自HTF筛选研究。HTF研究鉴定了两种提供良好稳定性的缓冲系统(组氨酸和琥珀酸盐,pH 6.25)。也将第三缓冲系统(50mM乙酸盐,pH 5.5)包括在内作为对照。使用小规模缓冲交换以及浓缩技术制备pH 6.25的组氨酸和琥珀酸盐缓冲系统的样品。然后添加以下赋形剂:0.02%的聚山梨醇酯80(PS80)以保护蛋白免受剪切应力;以及150mM氯化钠作为潜在的降粘度剂。

[0208] 将样品以1.2mL(或以1mL)体积填充在3mL玻璃小瓶中,并在2-8℃以250rpm在水平振荡器上避光振荡72小时。然后通过各种分析技术对样品进行测试。下表18列出了对于剪切应力/振荡研究所使用的制剂。包括了较低浓度制剂,因为此前的振荡研究并未尝试

50mg/mL。也将不含赋形剂(如PS80)的对照制剂包括在内。对于乙酸盐样品,包括了NaCl对照。

[0209] 表18.振荡研究设计和样品

[0210]

制剂#	样品类型	mAb 浓度 (mg/mL)	缓冲系统	pH	表面活性剂 (0.02%)	粘度调节剂 (150mM)
1	低浓度 mAb	50	50mM 乙酸钠	5.5	PS80	NaCl
2		50	20mM 琥珀酸钠	6.25	PS80	NaCl
3		50	20mM 组氨酸	6.25	PS80	NaCl
4	高浓度 mAb	200	50mM 乙酸钠	5.5	PS80	NaCl
5		200	20mM 琥珀酸钠	6.25	PS80	NaCl
6		200	20mM 组氨酸	6.25	PS80	NaCl
7	缓冲剂 对照	0	50mM 乙酸钠	5.5		
8		0	20mM 琥珀酸钠	6.25		
9		0	20mM 组氨酸	6.25		
10	NaCl 对照	200	50mM 乙酸盐	5.5		NaCl

[0211] 对于所有使用NaCl和聚山梨醇酯80配制的样品,没有观察到关于一般外观、SEC、DLS和MFI的显著变化。根据SEC-HPLC结果,高浓度蛋白制剂在乙酸盐(对照)制剂中不稳定。

[0212] 所有测试的抗-IL13mAb的目标浓度为200mg/mL,然而,由于处理产率的限制以及粘度测量本身的可变性,组氨酸和琥珀酸盐中的200mg/mL制剂的标称浓度在±10%的范围内。对于在振荡研究中所用的样品粘度的测量表明,在标称浓度为200mg/mL、含有150mM氯化钠的制剂中可实现粘度降低为1/6,而这与缓冲系统无关(图18)。在仅含缓冲剂的制剂中,相比于乙酸钠和琥珀酸钠,组氨酸显示出明显更高的粘度。这表明上述乙酸钠和琥珀酸钠缓冲剂中的钠离子可有助于降低粘度,因而还解释了氯化钠的钠离子可与粘度降低的效果有关。然而,由于将组氨酸与150mM氯化钠组合,粘度降低的程度与其它缓冲系统相同。这也可表明,在组氨酸缓冲剂与NaCl之间存在协同效应,其有效降低了粘度。

[0213] 该研究还包括了50mg/mL的较低浓度制剂1、2和3;然而,在这些制剂中未观察到差异,表明了目标浓度的高浓度制剂生成的稳定性数据的重要性(数据未显示)。

[0214] 图18中汇总了粘度对样品的蛋白浓度和钠含量的依赖性。50mg/mL(较低浓度)样品的粘度读数均小于2cps。标称浓度为200mg/mL、含有150mM NaCl的乙酸盐样品的粘度比相应的组氨酸和琥珀酸盐样品低约3cps,主要是由于处理产率差,导致浓度低于200mg/mL的标称浓度。如图18中所示,由于在制备浓缩样品期间的损失,总浓度低于200mg/mL。

[0215] 该研究的结果清楚地表明,包含150mM NaCl大幅降低了所有测试的缓冲系统的粘度。还独特地观察到关于组氨酸缓冲剂与NaCl之间的协同关系。

[0216] 注意：所有测试的抗-IL13mAb的目标浓度为200mg/mL，然而，由于处理产率的限制以及粘度测量本身的可变性，组氨酸和琥珀酸盐中200mg/mL制剂的标称浓度在±10%的范围内。

[0217] 实施例8：升高温度的物理性质的评估

[0218] 设计了以下研究，以评估当标称浓度为200mg/mL的高浓度抗-IL13在经过适当确定的升高温度被暴露于热应激时的物理性质。

[0219] 将样品在升高的温度50°C/60%RH培养7或10天。

[0220] 分析测试包括一般外观(GA)、粘度、通过A280nm获得的浓度、SEC-HPLC、MFI和DLS。表19汇总了该升高温度研究所用的样品制剂。

[0221] 表19：用于升高温度研究的制剂

[0222]	制剂#	mAb 浓度 (mg/mL)	缓冲系统	pH	表面活性剂 (0.02%)	粘度调节 剂(150mM)
	1	200	50mM 乙酸盐	5.5	PS80	NaCl
	2	200	20mM 琥珀酸盐	6.25	PS80	NaCl
	3	200	20mM 组氨酸	6.25	PS80	NaCl

[0223] 如表20和图19中所示，一般外观的结果显示，制剂1(乙酸盐)在7天后凝胶化。制剂2(琥珀酸盐)在储存10天后显示了半凝胶化，同时制剂3(组氨酸)在储存10天后显示无样品凝胶化。在任何未凝胶化的样品中都未观察到颗粒。7天和10天的琥珀酸盐和组氨酸样品被归类为“彩色乳光状”(milky iridescent)。乳光状等同于透明度下降，这标志着高浓度的显微镜下可见颗粒和聚集。MFI结果(未显示)表明，t=0的制剂1(乙酸盐)相比于其它制剂多了~50%的颗粒。

[0224] 表20：计划的50°C/60%RH的2周升高温度研究的GA结果

[0225]	制剂	时间(天数)	一般外观(GA)
	制剂 1: 乙酸盐	0	乳光状
		7	凝胶, 彩色乳光状
		10	凝胶比 7 天的凝胶更深、更呈固态且更不透光
	制剂 2: 琥珀酸盐	0	乳光状
		7	乳光状 (比最初更呈乳光状)
		10	半凝胶化(可在小瓶中移动的凝胶), 乳状
	制剂 3: 组氨酸	0	乳光状
		7	彩色乳光状
		10	彩色乳光状溶液

[0226] 该研究结果清楚地表明，150mM NaCl与pH 6.25的组氨酸缓冲剂的组合防止了凝胶化现象。该结果还表明，缓冲剂类型对物理稳定性具有显著影响(组氨酸>琥珀酸盐>乙酸盐)。这些结果暗示，在组氨酸缓冲剂和NaCl之间存在着增强高浓度mAb制剂的物理稳定性的协同关系。

[0227] 实施例9：200mg/mL冷冻-解冻研究

[0228] 该研究的目的是评估在2-8℃和-70℃之间的三次冷冻-解冻循环对标称浓度为200mg/mL的抗-IL13mAb的物理和化学稳定性质的影响。冷冻-解冻研究检验了在pH 6.25的15mM组氨酸缓冲剂(含有100mM或150mM NaCl, 0.05mM EDTA, 0.02%聚山梨醇酯80)中的稳定性。将基于乙酸盐的制剂包括在内作为对照(pH 5.5)。将样品以1.2mL的填充体积填充到3mL的玻璃小瓶中,并对其进行避光进行三次2-8℃和-70℃之间的冷冻-解冻循环。表21显示了该研究的样品。

[0229] 表21:用于冷冻-解冻研究测试的样品制剂

[0230]

制剂		
200 mg/mL 抗-IL 13, 溶于 pH 6.25 的 15 mM 组氨酸+ 0.05mM EDTA + 0.02% 聚山梨醇酯 80 + 100mM NaCl	A	对照
	F/T -A	3 次冷冻/解冻循环
200mg/mL 抗-IL13, 溶于 pH 6.25 的 15mM 组氨酸+ 0.05mM EDTA + 0.02% 聚山梨醇酯 80 + 150mM NaCl	B	对照
	F/T -B	3 次冷冻/解冻循环
200 mg/mL 抗-IL13, 溶于具有各种赋 形剂的 pH 5.5 的基于乙酸盐的制剂	C	对照
	F/T -C	3 次冷冻/解冻循环

[0231] 使用以下分析技术对样品进行分析:GA、pH、粘度、通过A280nm获得的浓度、通过SPR获得的效力、SDS-PAGE、SEC-HPLC、cIEF和MFI。

[0232] 冷冻/解冻(F/T)。根据一般外观、pH、通过SPR获得的效力、浓度、SEC、SDS-PAGE或粘度,对于任何制剂,在F/T和对照样品的结果之间不存在显著差异。对于组氨酸制剂,不存在相对于初始的cIEF主峰%的降低。表22列出了所有的一般外观、pH、效力、浓度和粘度数据。表23列出了所有SDS-PAGE数据。表24列出了所有SEC和cIEF数据。

[0233] 该研究的整体结果清楚地表明,150mM NaCl与pH 6.25的组氨酸缓冲剂的组合是最佳制剂,并且在经受了冷冻-解冻应激之后保持稳定。

[0234] 表22:冷冻-解冻的GA、pH、效力、浓度和粘度的分析测试结果

[0235]

样品说明	一般外观	pH	效力 (Biacore) (mg/mL)	浓度(mg/mL)	粘度 (cps)
A	乳光状, BY4,	6.16	191.4	197.5	17.9

[0236]

	几乎无可见 颗粒				
F/T -A	乳光状, BY4, 几乎无可见 颗粒	6.22	197.8	195.1	17.7
B	乳光状, BY4, 几乎无可见 颗粒	6.24	190.0	196.5	16.6
F/T -B	乳光状, BY4, 几乎无可见 颗粒	6.24	197.3	201.0	16.6
C	乳光状, BY5, 几乎无可见 颗粒	5.57	166.8	186.5	19.5
F/T -C	乳光状, BY5, 几乎无可见 颗粒	5.57	171.3	199.1	18.9

[0237] 表23:冷冻-解冻研究结果(SDS-PAGE)

[0238]

样品说明	非还原			还原		
	主峰%	聚集物%	片段%	重链%	轻链%	% H+L
A	82.8	0.8	10.7	64.8	32.3	97.1
F/T -A	82.4	0.6	11.1	65.6	31.2	96.8
B	83.6	0.7	10.3	65.0	31.5	96.6
F/T -B	83.6	0.6	10.4	65.8	31.0	96.8
C	80.1	1.1	12	63.3	32.0	95.2
F/T -C	78.8	1.2	12.9	63.9	31.5	95.4

[0239] 表24:冷冻-解冻研究结果(SEC、cIEF)

[0240]

样品说明	SEC			cIEF				
	总聚 集物 %	单体%	片段 %	条带数 #	pI 主峰	主峰 %	酸性物 %	碱性 物%
A	2.5	97.5	0.1	7	7.68	70.7	9.5	19.9
F/T -A	2.5	97.4	0.0	7	7.68	72.8	9.2	18.1
B	2.4	97.5	0.1	7	7.68	71.2	8.9	20.1
F/T -B	2.4	97.5	0.1	7	7.68	73.0	7.7	19.3
C	2.1	97.9	0.1	7	7.68	65.9	12.1	22.1
F/T -C	2.1	97.8	0.1	7	7.68	65.6	12.0	22.5

[0241] 实施例10:标称浓度为200mg/mL时基于mAb的药物产品的短期化学稳定性研究以及生物物理特性

[0242] 进行开发稳定性研究以评估含有NaCl、PS80和EDTA的200mg/mL mAb制剂的短期化

学稳定性。短期化学稳定性研究检验在pH 6.25的15mM组氨酸缓冲剂(其含有100mM或150mM NaCl、0.05mM EDTA和0.02%聚山梨醇酯80)中的稳定性。将基于乙酸盐的制剂包括在内作为对照。将样品以1.2mL的填充体积填充到3mL的玻璃小瓶中,并置于以下储存条件中:5℃、25℃和40℃。下表25显示了该研究的样品。

[0243] 表25:短期化学稳定性样品以及初始渗透压结果

[0244]

制剂	制剂编号	渗透压(mOsm)
200 mg/mL 抗-IL13,溶于 pH 6.25 的 15 mM 组氨酸+ 0.05mM EDTA + 0.02% 聚山梨醇酯 80 + 100mM NaCl	A	216
200 mg/mL 抗-IL13,溶于 pH 6.25 的 15 mM 组氨酸+ 0.05mM EDTA + 0.02% 聚山梨醇酯 80 + 150mM NaCl	B	333
200mg/mL 抗-IL13 溶于 pH5.5 的 50mM 乙酸盐 + 51mM NaCl + 0.05mM EDTA + 1% 精氨酸 + 0.02% 聚山梨醇酯 80	C	293

[0245] 通过以下分析技术分析样品:GA、pH、粘度、通过A280nm获得的浓度、通过SPR获得的效力、SDS-PAGE、SEC-HPLC和cIEF。该研究总共持续3个月,并且在最初和最终时间点还通过DSC、DLS、CD和MFI进行了各种生物物理特性测试。

[0246] 分析(浓度、效力、SEC、SDS-PAGE、cIEF)和生物物理特性(DSC、荧光、CD)测试的结果表明,制剂B(200mg/mL抗-IL13,溶于pH 6.25的15mM组氨酸、150mM NaCl、0.05mM EDTA、0.02%聚山梨醇酯80)在短期化学稳定性方面在三种制剂中最好。

[0247] 分析测试结果的总结及讨论:

[0248] 表26总结了通过所有分析技术在长达3个月期间的5℃数据,且表27总结了在长达3个月期间在25℃和40℃的应激和加速数据。

[0249] 相比于乙酸盐对照样品,组氨酸制剂(A和B)中的样品在5℃和25℃3个月呈现出更高的主峰%,如通过cIEF确定。通过SDS-PAGE确定的纯度表明,相对于乙酸盐对照样品,在25℃3个月两种组氨酸制剂(A和B)中的样品具有更高的重链和轻链百分比含量(%)。在40℃/75%RH的储存条件中,在1个月,所有三种制剂相对于最初均呈现出较低的H+L的百分比含量(H+L%),然而制剂A和B优于制剂C(90.6%和91.8%,相对于88.2%)。对于所有40℃1个月的样品,均存在主峰%的显著降低,但相比于乙酸盐制剂的变化(9.9%),组氨酸制剂降低得更少(8.8%或7.5%),其中制剂B显示出最小的降低%。在25℃/60%RH的3个月的时间点以及40℃/75%RH的1个月的时间点,在含有150mM NaCl的基于组氨酸的制剂B中观察到最高的效力结果,在此前的和对照的基于乙酸盐的制剂C(其对于高浓度mAb未提供合适的稳定性)中观察到最低效力。制剂A和B初始测试的粘度结果(18.0和16.3cps)低于制剂C(18.7cps),正是由于制剂A和B中更高的NaCl浓度(分别为100mM和150mM NaCl)。制剂B的粘度结果在所有条件和时间点都最低。

[0250] 表26:短期化学稳定性的5℃数据

[0251]

测定	制剂编号	起始			1 个月, 5°C			3 个月, 5°C			16 个月, 5°C		
一般外观	A	乳光状, 介于 B5 和 B4 之间, 无可见颗粒			乳光状, BY4, 几乎无可见颗粒			乳光状, BY4, 几乎无可见颗粒			乳光状, BY4, 基本无可见颗粒		
	B	乳光状, 介于 B5 和 B4 之间, 无可见颗粒			乳光状, BY4, 几乎无可见颗粒			乳光状, BY4, 几乎无可见颗粒			乳光状, BY4, 基本无可见颗粒		
	C	乳光状, 介于 B5 和 B4 之间, 无可见颗粒			乳光状, BY5, 几乎无可见颗粒			乳光状, BY5, 几乎无可见颗粒			乳光状, BY5, 基本无可见颗粒		
pH	A	6.24			6.23			6.21			6.20		
	B	6.26			6.24			6.24			6.19		
	C	5.55			5.58			5.64			5.60		
效力	A	197.6			197.5			190.0			NT		
	B	194.2			194.2			185.0			NT		
	C	173.9			171.8			170.0			NT		
浓度(mg/mL)	A	202.6			196.12			195.0			196.2		
	B	202.6			196.94			198.9			198.1		
	C	208.2			190.46			185.7			199.4		
SDS-PAGE (%H+L, 还原)	A	NT			97.5			97.0			97.9		
	B	NT			97.6			97.0			97.7		
	C	NT			96.2			96.0			96.0		
SEC 总聚集体%/单体%/片段%	A	2.4	97.6	0.0	3.0	96.9	0.1	2.6	97.3	0.1	3.0	96.9	0.1
	B	2.3	97.7	0.0	3.0	96.9	0.1	2.5	97.4	0.1	3.0	96.9	0.1
	C	2.0	98.0	0.0	2.1	97.8	0.1	2.0	97.9	0.1	2.1	97.8	0.1
cIEF pI/ 主峰%	A	7.67		70.9	7.68		71.4	7.68		73.4	7.68		73.6
	B	7.67		70.6	7.68		71.8	7.68		73.9	7.68		73.6
	C	7.68		63.7	7.68		65.0	7.68		66.5	7.68		67.4
粘度 (cp)	A	18.0			17.6			18.4			15.87		
	B	16.3			16.3			17.0			14.85		
	C	18.7			18.5			18.8			16.41		

[0252] 表27:短期化学稳定性的应激及加速数据

[0253]

测定	制剂编号	最初			1 个月, 40°C			3 个月, 25°C		
一般外观	A	乳光状, 介于 B5 和 B4 之间, 无可见颗粒			乳光状, BY4, 几乎无可见颗粒			乳光状, BY4, 几乎无可见颗粒		
	B	乳光状, 介于 B5 和 B4 之间, 无可见颗粒			乳光状, BY4, 几乎无可见颗粒			乳光状, BY4, 几乎无可见颗粒		
	C	乳光状, 介于 B5 和 B4 之间, 无可见颗粒			乳光状, BY5, 几乎无可见颗粒			乳光状, BY5, 几乎无可见颗粒		
pH	A	6.24			6.18			6.20		
	B	6.26			6.22			6.22		
	C	5.55			5.51			5.66		
效力	A	197.6			138.1			167.0		
	B	194.2			149.0			176.0		
	C	173.9			124.8			146.0		
浓度(mg/mL)	A	202.6			195.12			185.1		
	B	202.6			199.04			195.1		
	C	208.2			187.39			200.3		
SDS-PAGE (%H+L, 还原)	A	NT			90.6			95.7		
	B	NT			91.8			95.3		
	C	NT			88.2			93.1		
SEC 总聚集物%/ 单体%/片段%	A	2.4	97.6	0.0	5.3	92.9	1.8	3.6	94.7	1.7
	B	2.3	97.7	0.0	5.2	93.1	1.7	3.6	94.9	1.5
	C	2.0	98.0	0.0	4.8	93.5	1.8	2.6	95.6	1.9
cIEF pI/ 主峰%	A	7.67		70.9	7.68		62.1	7.68		70.9
	B	7.67		70.6	7.68		63.1	7.68		69.8
	C	7.67		63.7	7.68		53.8	7.68		60.6
粘度 (cps)	A	18.0			18.2			19.1		
	B	16.3			17.2			16.5		
	C	18.7			20.0			19.3		

[0254] 生物物理特性结果的总结和讨论:

[0255] 表28显示了在最初的DLS数据和在最初以及3个月时的荧光数据。

[0256] MFI结果显示,在3个月内,没有在任何样品中观察到可见颗粒。通过DLS (其测量mAb的流体动力学半径),没有在三中样品中观察到显著的差异。荧光和圆二色谱数据表明,在储存3个月后,组氨酸制剂中无二级和三级结构的波动。图20显示了光谱的CD比较图。制剂C样品较低信号表明存在三级结构的变化。关于制剂C在淬灭%上所见的差异也表明对于该制剂存在三级结构的变化。表29中显示了对于最初和3个月的样品的DSC数据。两种组氨酸/NaCl制剂更高的T_m和总千卡/摩尔数结果的趋势表明,相比于乙酸盐制剂,其它的盐实现更高的热动力学稳定性。

[0257] 表28:短期化学稳定性的DLS和荧光数据

[0258]

样品	条件	DLS	荧光		
		Rh(nm)	最大(nm)	最大时的 F.I. (吸光度)	淬灭(%)
A	起始	5.5	340	402	n/a
B	起始	5.5	342	451	n/a
C	起始	5.7	341	365	n/a
A	3 个月, 5°C	NT	341	418	4.0
B	3 个月, 5°C	NT	341	454	0.7
C	3 个月, 5°C	NT	342	466	27.7
A	3 个月, 25°C	NT	341	352	-12.4
B	3 个月, 25°C	NT	341	407	-9.8
C	3 个月, 25°C	NT	342	452	23.8
A	16 个月, 5°C	NT	340	355	-11.7
B	16 个月, 5°C	NT	341	402	-10.9
C	16 个月, 5°C	NT	342	436	19.5

[0259] 表29:短期化学稳定性的DSC数据

[0260]

制剂编号		Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	总面积 千卡/摩尔数
A	起始	68.7	74.0	82.8	960
A	3 个月, 5°C	68.6	74.0	82.8	988
A	3 个月, 25°C	68.5	74.5	82.9	1122
A	16 个月, 5°C	68.8	74.3	82.8	902
B	起始	68.4	73.4	82.7	1036
B	3 个月, 5°C	68.4	73.4	82.6	965
B	3 个月, 25°C	68.3	73.8	82.7	1055
B	16 个月, 5°C	68.4	73.5	82.6	1081
C	起始	67.9	73.1	82.9	884
C	3 个月, 5°C	67.7	73.1	82.9	891

[0261]

C	3 个月, 25°C	67.7	73.6	83.0	947
C	16 个 月, 5°C	67.7	73.2	82.8	928

[0262] 实施例11: 标称浓度为200mg/mL的基于mAb的药物产品的长期化学稳定性研究以及生物物理特性

[0263] 如表26中所列, 测试所有样品在16个月时间点的稳定性。使用该时间点的结果来评估标称浓度为200mg/mL的在His、NaCl、PS80和EDTA中配制的mAb药物产品的长期化学稳定性。进行有限的检测以确认长期稳定性。

[0264] 通过以下分析技术对样品进行分析: GA、pH、粘度、通过A280nm获得的浓度、SDS-PAGE、SEC-HPLC和cIEF。还进行生物物理特性测试, 包括荧光、DSC和CD。

[0265] 表26包括了通过所有分析技术获得的在16个月时间点的5°C数据。

[0266] 分析测试结果的总结和讨论: 组氨酸制剂(A和B)中的样品在5°C、16个月后呈现出较高的单体含量(%)。制剂C比两种组氨酸制剂高0.9%。

[0267] 生物物理特性结果的总结和讨论: 整体而言, 在3个月和16个月时间点之间, 生物物理特性的结果是相当的。荧光和圆二色谱数据表明, 在储存16个月后, 组氨酸制剂无二级结构和三级结构波动。5°C、16个月的制剂A和B样品的结果未显示显著变化。在两种制剂C样品中存在显著的强度增加, 这表明该分子解折叠, 并暴露出更多的荧光基团。根据对制剂A和B的MFI结果的分析, 在16个月的时间点, 可见颗粒未增加。16个月时间点的样品的DSC数据。两种组氨酸/NaCl制剂更高的T_m和总千卡/摩尔数结果的趋势表明, 相比于乙酸盐制剂, 其它的盐实现更高的热动力学稳定性。

[0268] 表28显示了16个月时间点的荧光数据。表29显示了16个月时间点的DSC结果。

[0269] 分析(浓度、效力、SEC、SDS-PAGE、cIEF)和生物物理特性(DSC、荧光、CD)测试的结果表明, 就长期化学稳定性而言, 制剂A(200mg/mL抗-IL13于pH 6.25的15mM组氨酸、150mM NaCl、0.05mM EDTA、0.02%聚山梨醇酯80中)是三种制剂中最佳的。

[0270]

序列表

SEQ ID NO: 1 BLyS

MEDSTEREQS RLTSCLKKPE EMKLKECVSI LPRKESPSVR SSKEGKLLAA TLLIALLSCC
LTVVSFYQVA ALOGLASLR AELOGHBAEK LPAGAGAPKA GLEZAPAVTA GLKIEFPFAP
GEGNSSQNSR NKRAVOGPRE TVTQDCLOLI ADSETPTIQK GSYTFVPWLL SFKRGSALEE
KENKILVKET GYFFIYGQVL YTDKTYAMGH LIQRKKVHVF GDELSLVTLE PCIQNMPETL
PNNSCYSAGI AKLEEGDELQ LAIPRENAQI SLOGDVTEFG ALKLL

SEQ ID NO: 2 贝利单抗 VH

QVQLQQSGAE VKKPGSSVRV SCKASGGTFN NNAINWVRQA PGQGLEWMGG IIPMFGTAKY
SQNFQGRVAI TADESTGTAS MELSSLRSED TAVYYCARSR DLLLFPFHAL SPWGRGTMTV
VSS

SEQ ID NO: 3 贝利单抗 VL

SSELTQDPAV SVALGQTVRV TCQGDLSRSY YASWYQOKPG QAPVLVIYCK NNRPSGIPDR
FSGSSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCSSR DSSGNHWVFG GGTSLTVLG

SEQ ID NO: 4 Tabalumab VH

MKHLWFFLLL VAAFRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQPF
GKGLEWIGEI NHSGSTNYNP SLKSRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARGYYD
ILTGYYFYFD YWGQGTLLTV SS

SEQ ID NO: 5 Tabalumab VL

EIVLTQSPAT LSLSPGEFAT LSCRASQSVS RYLAWYQOKP QAPRLLIYD ASNBATGIFA
RFGSGSGGTD SLTISSLEP EDFAVYYCQ PSNWPRTFGQ GTRVEIKET

SEQ ID NO: 6 贝利单抗重链

QVQLQQSGAE VKKPGSSVRV SCKASGGTFN NNAINWVRQA PGQGLEWMGG IIPMFGTAKY
SQNFQGRVAI TADESTGTAS MELSSLRSED TAVYYCARSR DLLLFPFHAL SPWGRGTMTV
VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTRVDKK VEPRSCDKTH TCPPCTAFEL
LGGPSVFLEP PKFKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKFREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PFVLDSDGSF FLYSKITVDK
SRWQQGNVFS CSVMHEALHN NYTQKSLSLG PGK

SEQ ID NO: 7 贝利单抗轻链

SSELTQDPAV SVALGQTVRV TCQGDLSRSY YASWYQOKPG QAPVLVIYCK NNRPSGIPDR
FSGSSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCSSR DSSGNHWVFG GGTSLTVLGQ PKAAPSVTLF
PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTFSKQS NKKYAASSYL
SLTPEQWESH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TRCS

SEQ ID NO: 8 Tabalumab 重链

[0271]

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQ PGRGLEWIGE INHSGSTNYN
PSLKSRTVIS VDTSKNQPSL KLSSVTAADT AVYYCARGY DILTGYYYYF DYWGQGT LVT
VSSASTKGPS VFPLAPCERS TSESTAALGC LVKDYPPEPV TVSWNSGALT SCVHTFP PAVL
QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDS KPSQTKVDK R VESKYGP PCP PCPAPF LGG
PSVFLFPKFP KDTLMISRTF EYTCVVVDVS QEDFEVQFNW YVDGVEVHNA KTKFREEQFN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVENKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTFPV LQSDGSEFLY SRLTVDKSRW
QEGNVFSCSV MHEALNNRYT QKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 9 Tabalumab 轻链

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQXP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA
RFGSGSGGTD STLTSSLEP EDAFVYYCQQ RSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

SEQ ID NO: 10 可溶形式的 BLYS

AVQGPEETVT QQCLOLIADS ETPTIQKSY TFVPWLLSFK RGSALLEKEN KILVKETGYF
FIYGOVLYTD KTYAMGHLIQ RKKVHVFGDE LSLVTLFRCI QNMPETLPNN SCYSAGIAKL
EEGDELQLA PRENAQISLD GGVTFFGALK LL

SEQ ID NO: 11 贝利单抗 CDRH1

GGTFNNNAIN

SEQ ID NO: 12 贝利单抗 CDRH2

GLIPMFGTAK YSQNEQG

SEQ ID NO: 13 贝利单抗 CDRH3

SRDLLLFPHH ALSP

SEQ ID NO: 14 贝利单抗 CDRL1

QGDSLRSYYA S

SEQ ID NO: 15 贝利单抗 CDRL2

GKNNRPS

SEQ ID NO: 16 贝利单抗 CDRL3

SSRDSSGNHW V

序列表

<110> BLAKE-HASKINS, Angela

MARSHALL, Tristan

PERKINS, Melissa D.

O'BERRY, Kristen

CROTTS, George H.

PURI, Manasi

DUNLEAVY, Donna M.

<120> 抗体制剂

<130> PU65703

<140> 尚未分配

<141> 2015-05-15

<150> 61/994427

<151> 2014-05-16

<150> 62/093734

<151> 2014-12-18

<150> 62/095181

<151> 2014-12-22

<160> 16

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 285

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BLyS

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 1

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu

1 5 10 15

Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro

20 25 30

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu

35 40 45

Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val

50 55 60

Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg

65	70	75	80
Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly			
	85	90	95
Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu			
100	105	110	
Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn			
115	120	125	
Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln			
130	135	140	
Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys			
145	150	155	160
Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser			
	165	170	175
Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr			
180	185	190	
Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met			
195	200	205	
Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu			
210	215	220	
Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu			
225	230	235	240
Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly			
	245	250	255
Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu			
260	265	270	
Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu			
275	280	285	

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn			
20	25	30	
Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			

35	40	45
Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe	Gly Thr Ala Lys Tyr Ser Gln Asn Phe	
50	55	60
Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Gly Thr Ala Ser		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Ser Arg Asp Leu Leu Leu Phe Pro His His Ala Leu Ser Pro		
100	105	110
Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 3

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Val Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 4

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 4

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
 115 120 125
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 6

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 6

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Arg	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Asn	Asn	Asn
			20					25					30		
Ala	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Met	Phe	Gly	Thr	Ala	Lys	Tyr	Ser	Gln	Asn	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Ala	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Gly	Thr	Ala	Ser
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	Ser	Arg	Asp	Leu	Leu	Leu	Phe	Pro	His	His	Ala	Leu	Ser	Pro
			100					105					110		
Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
	115					120						125			
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
	130					135					140				
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155				160	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
			165					170				175			
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
		180					185					190			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
	195					200					205				
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
	210				215					220					
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
225				230						235				240	
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			245					250				255			

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 7
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。
 <400> 7
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Val Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140
 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210
 <210> 8
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。
 <400> 8
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				85					90					95		
Arg	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	
				100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
				115					120					125		
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	
				130					135					140		
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
145					150					155					160	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
				165					170					175		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
				180					185					190		
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	
				195					200					205		
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	
				210					215					220		
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245					250					255		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	
				260					265					270		
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				275					280					285		
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
				290					295					300		
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	
				325					330					335		
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350		
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				355					360					365		
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
				370					375					380		
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	

385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp			
	405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu			
	435	440	445
Gly Lys			
450			
<210> 9			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。			
<400> 9			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			

Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn Ala Ile Asn

1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 12

Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Ala Lys Tyr Ser Gln Asn Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 13

Ser Arg Asp Leu Leu Leu Phe Pro His His Ala Leu Ser Pro

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 14

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 15

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利用分子生物学技术鉴定的氨基酸序列。

<400> 16

Ser Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Trp Val

1

5

10

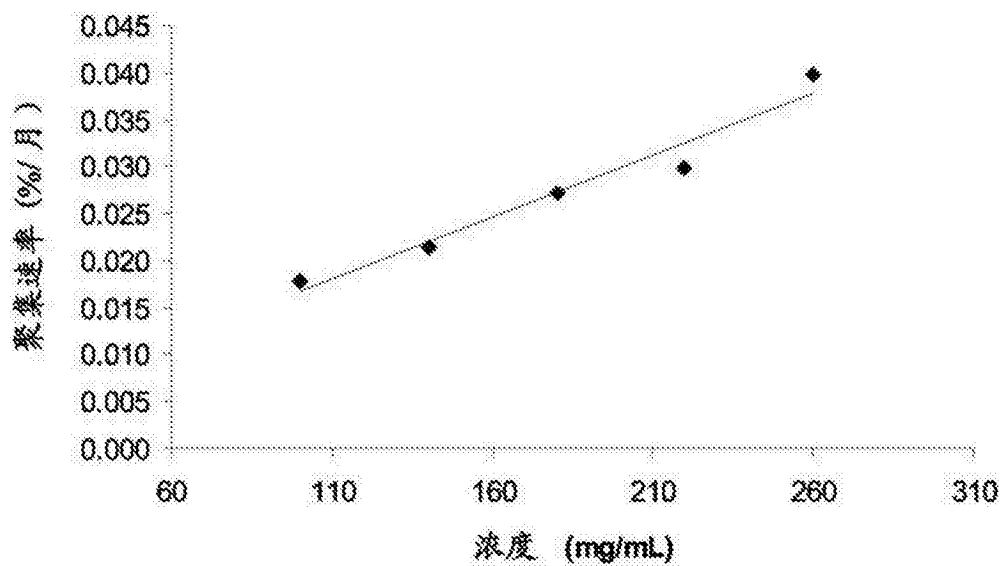


图1

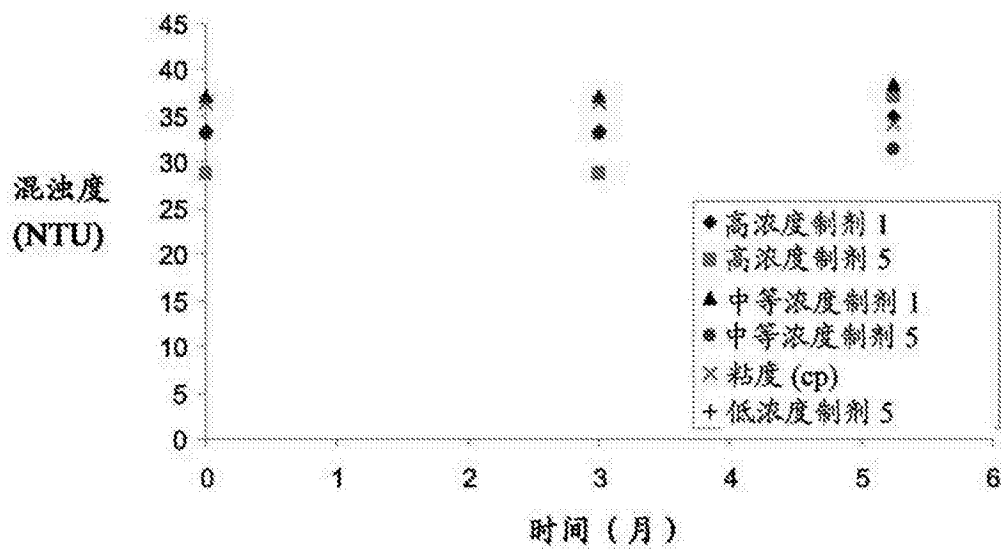


图2

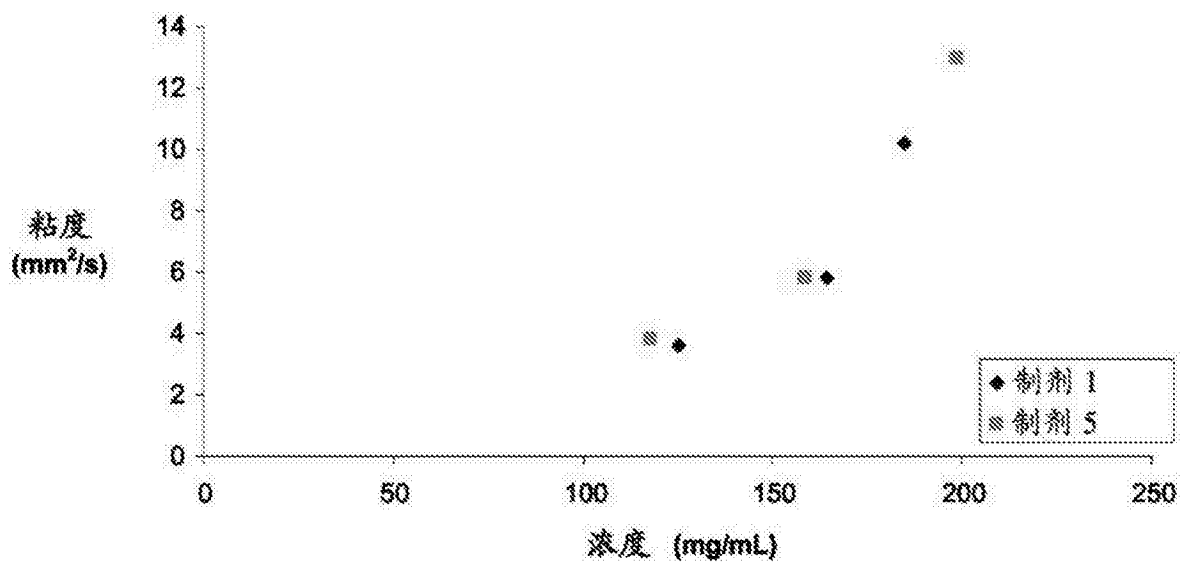


图3

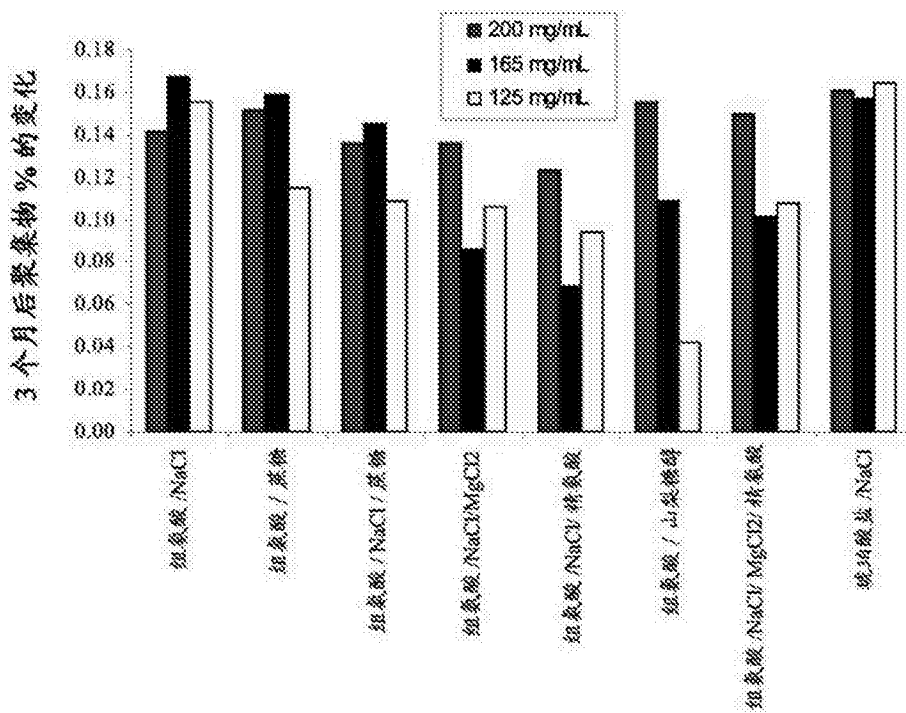


图4

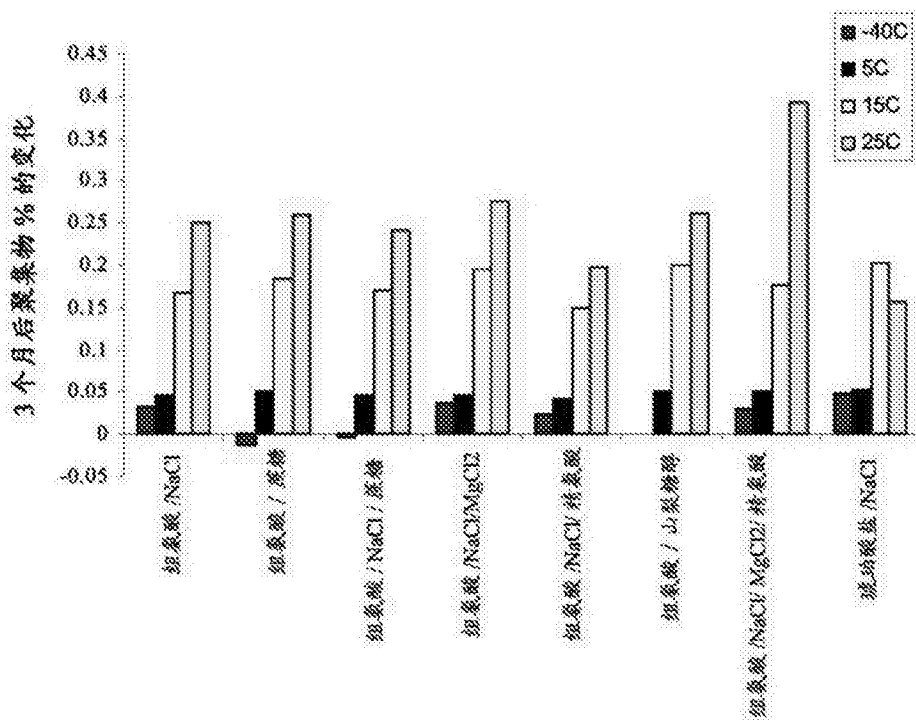


图5

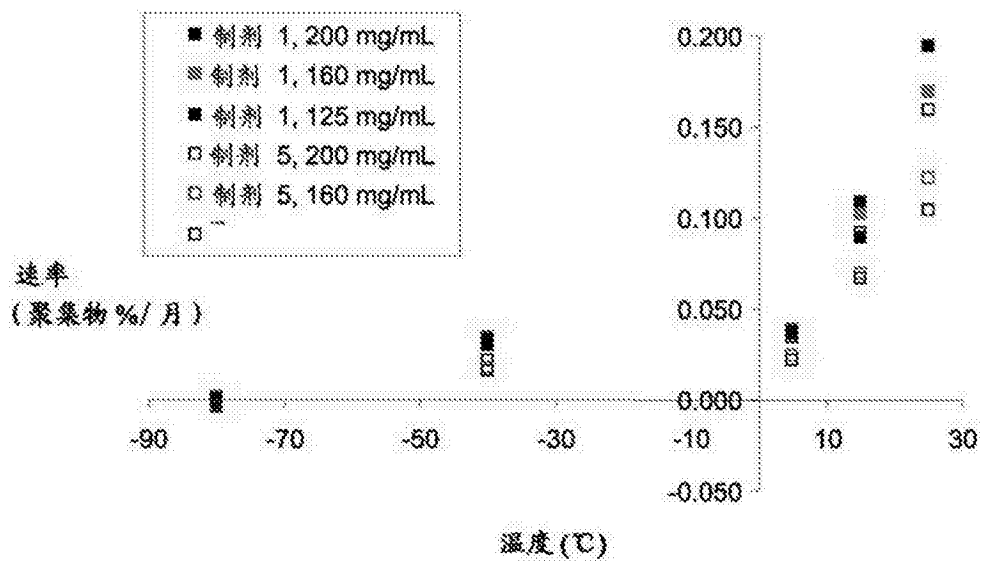


图6

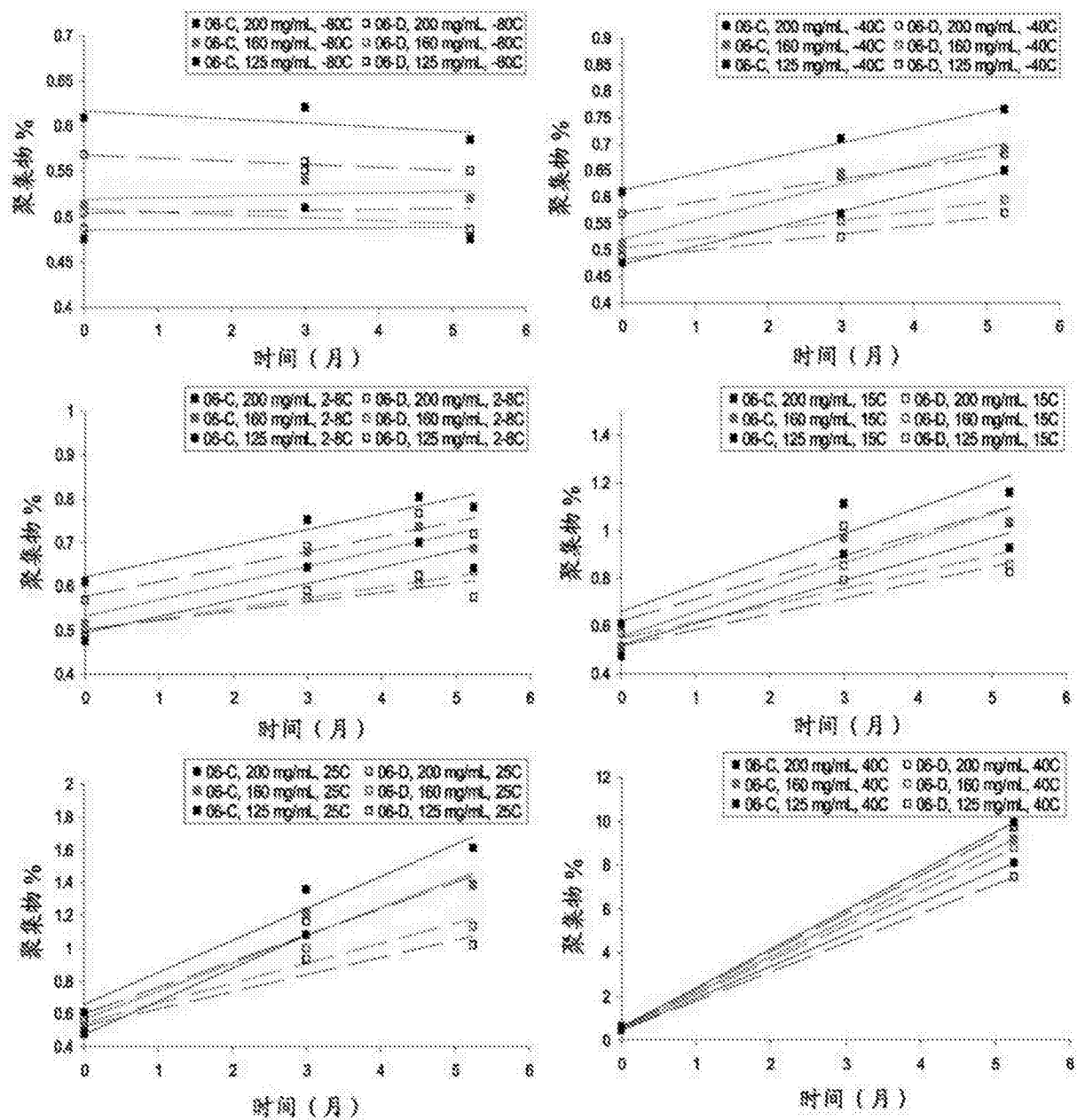


图7

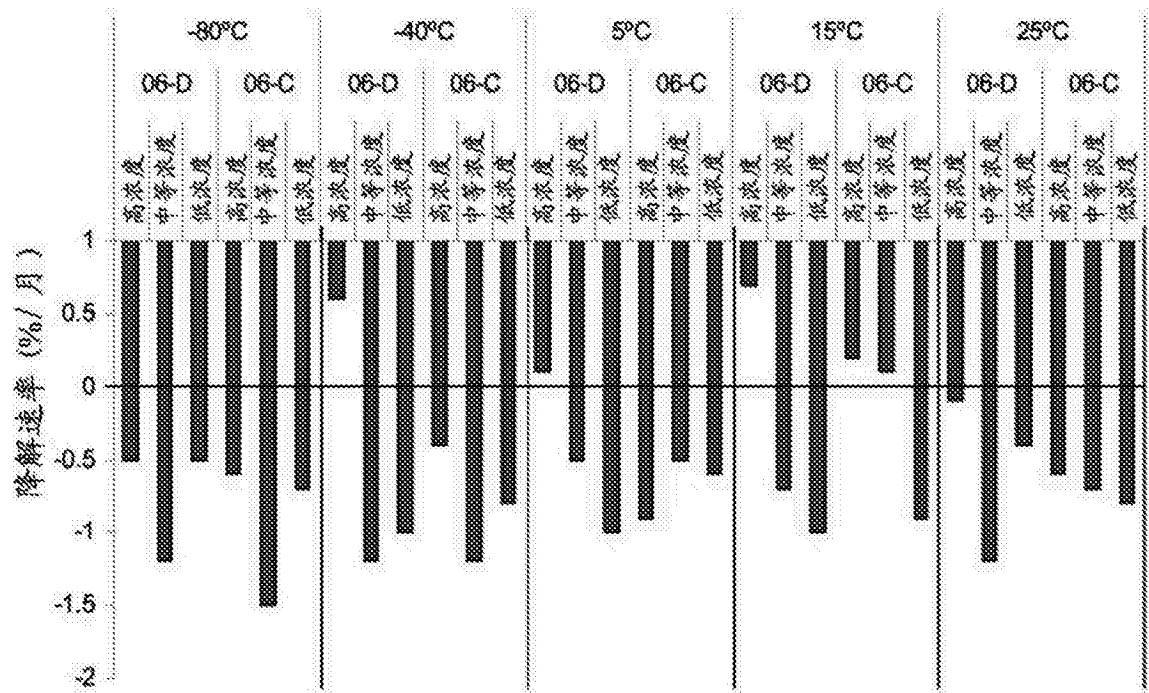


图8

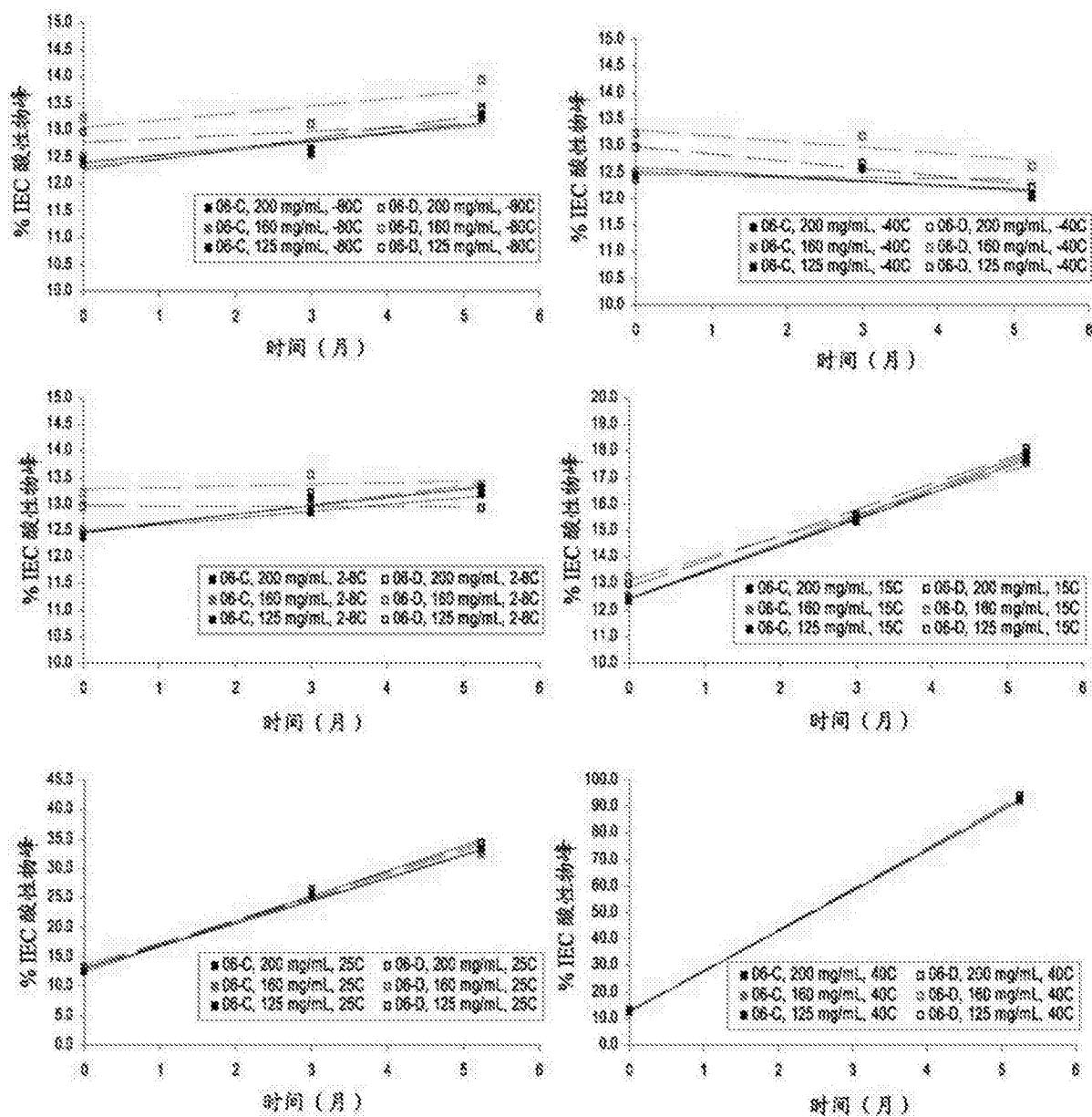


图9

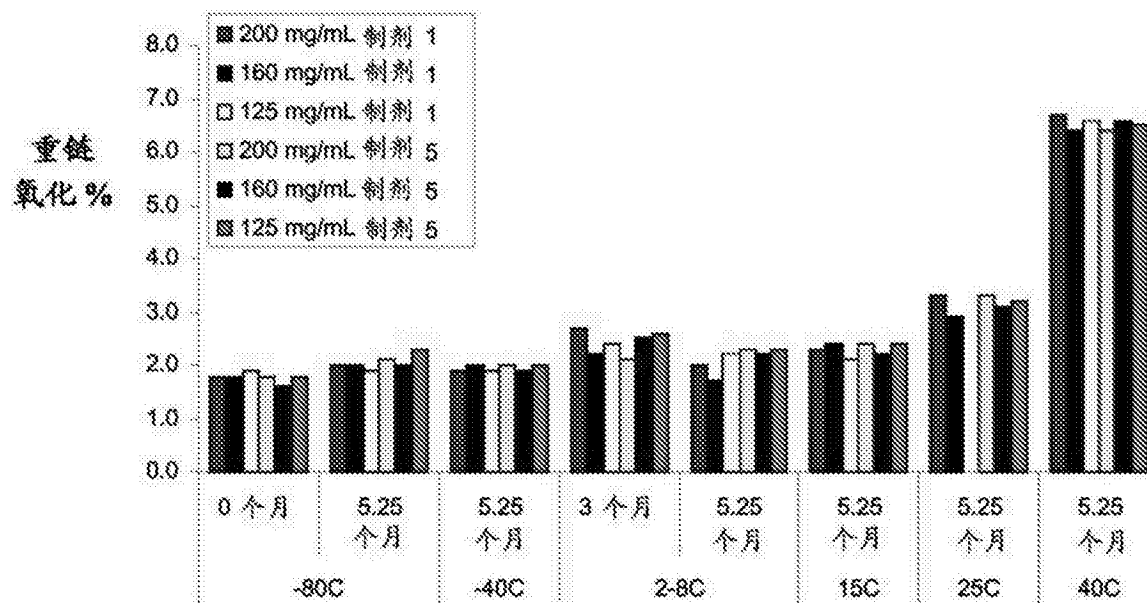


图10

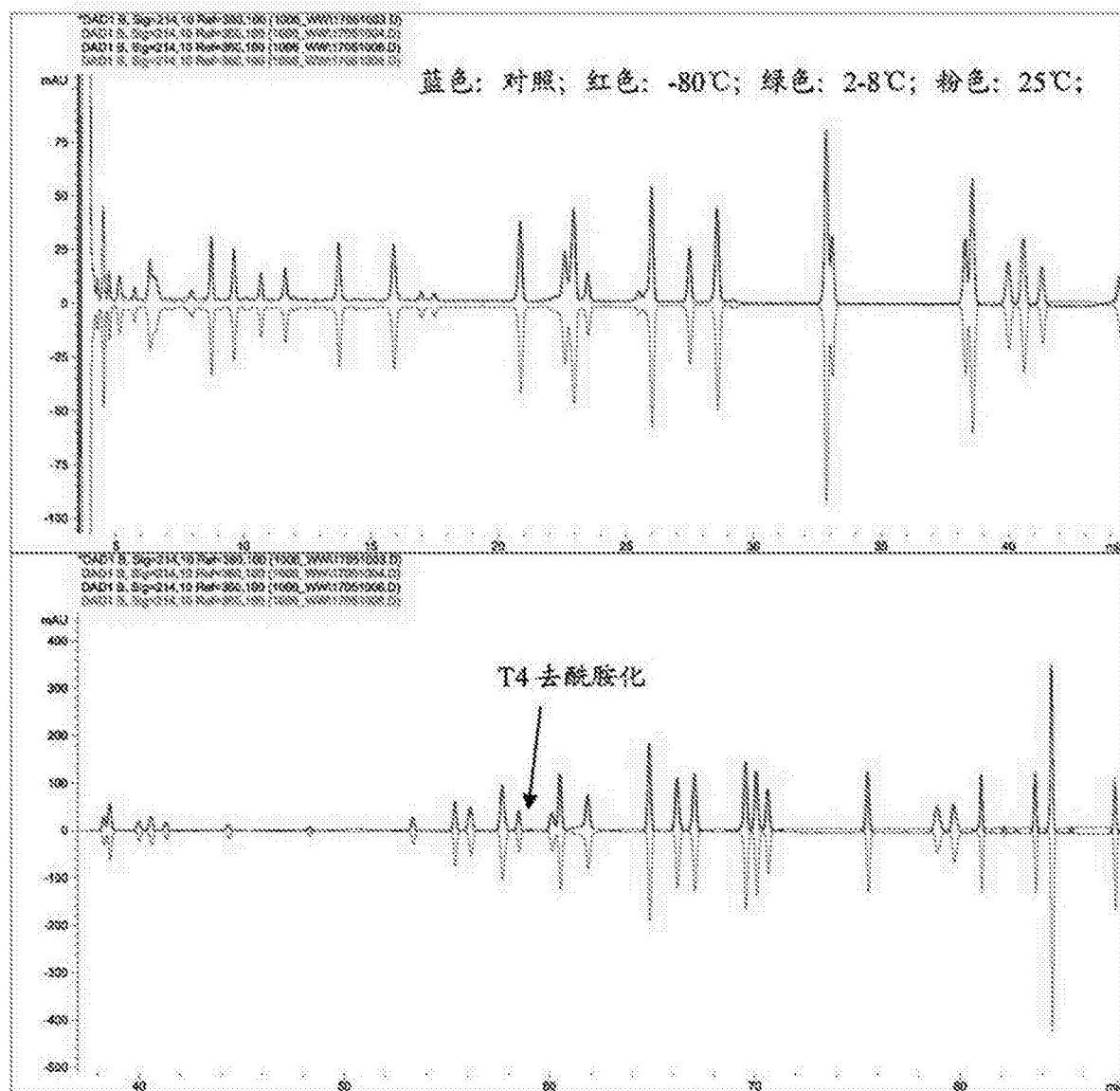
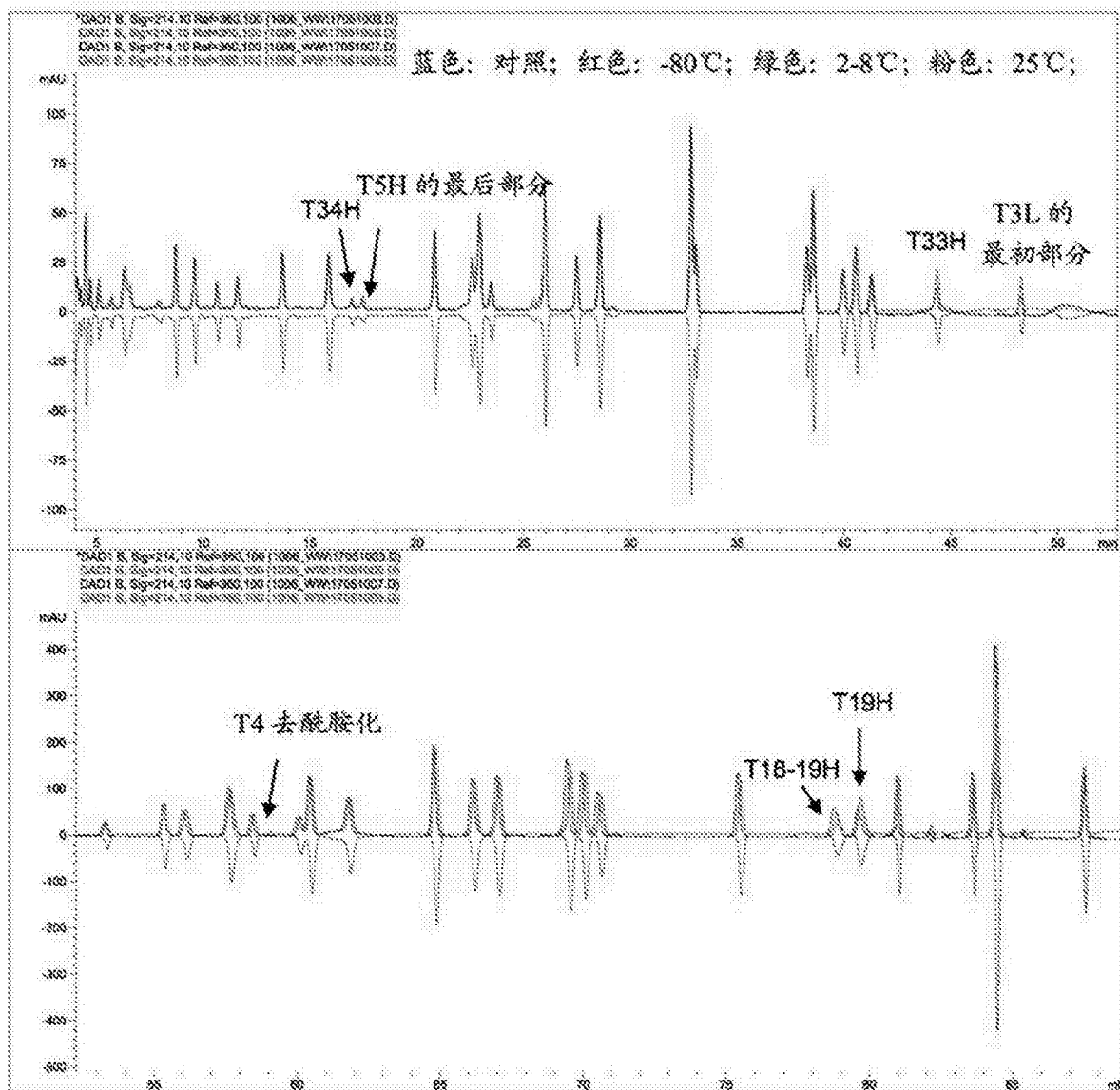


图11



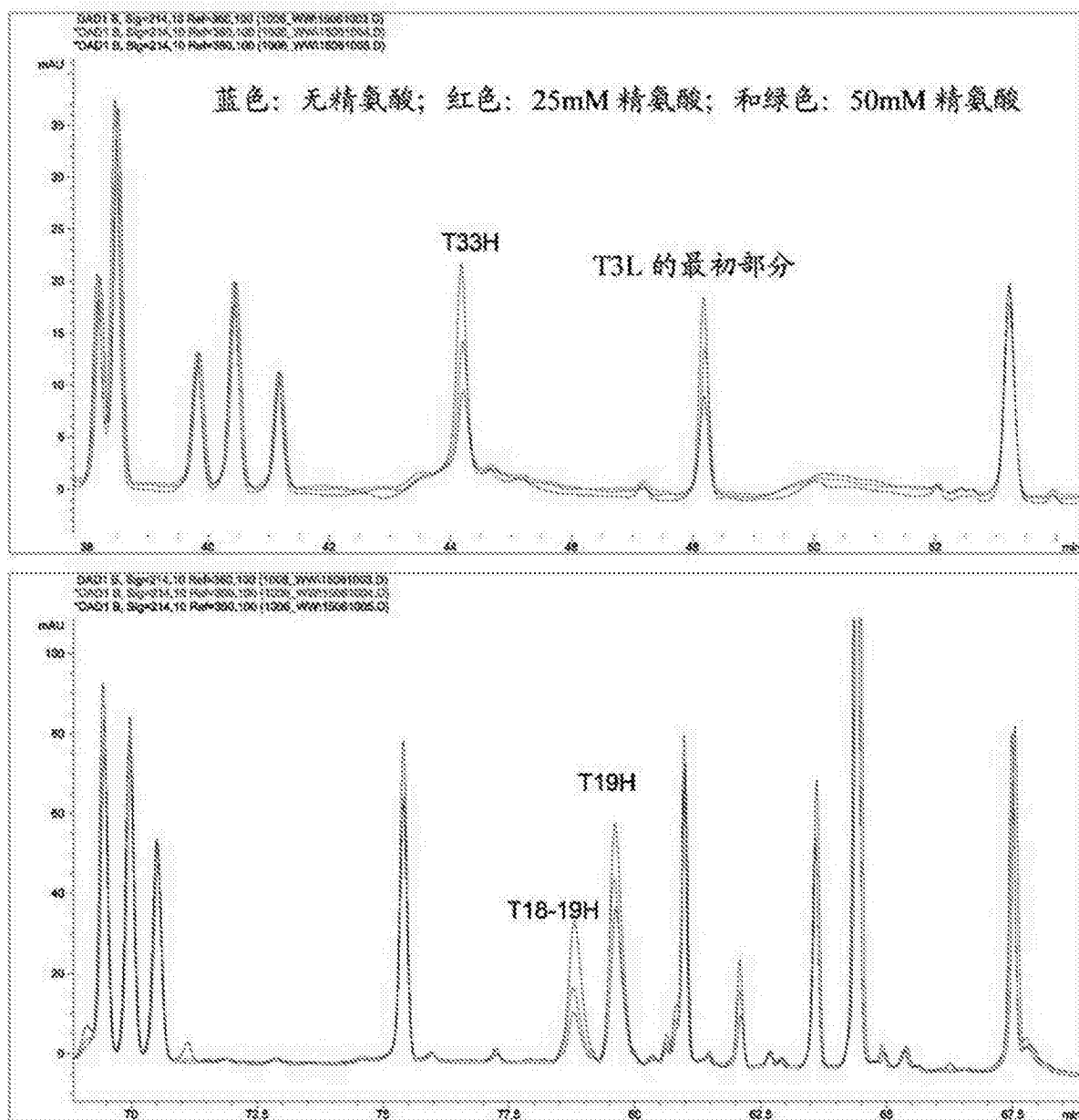


图13

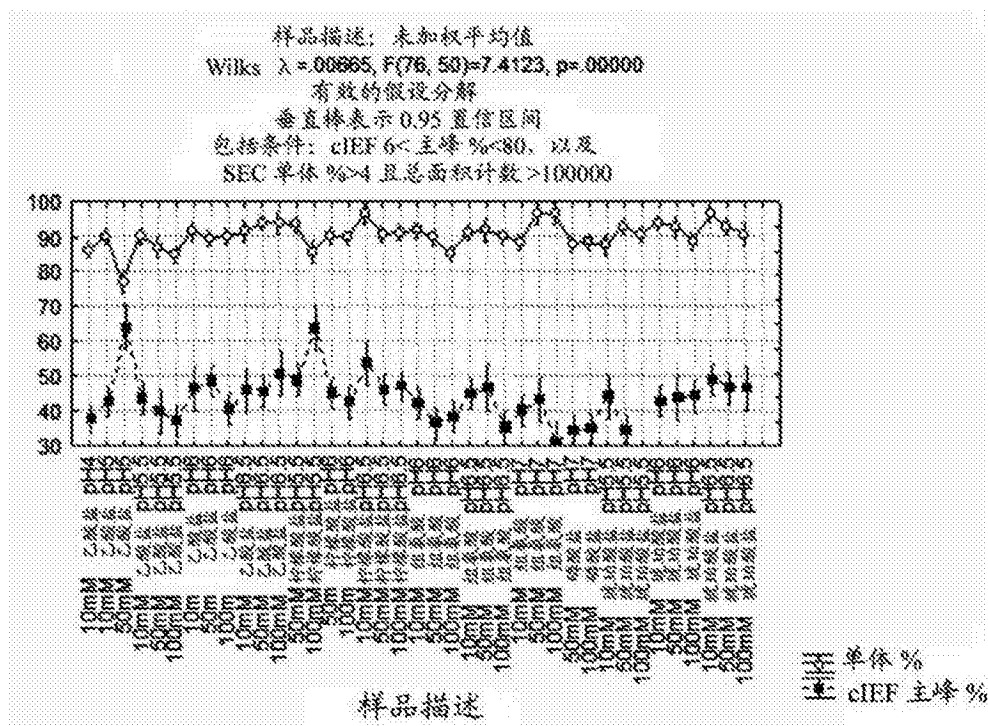


图14

Design-Expert (®) 软件

SEC 单体

● 设计点

■ B1 乙酸盐

▲ B2 琥珀酸盐

★ B3 组氨酸

X1 = A: pH

X2 = B: 缓冲剂

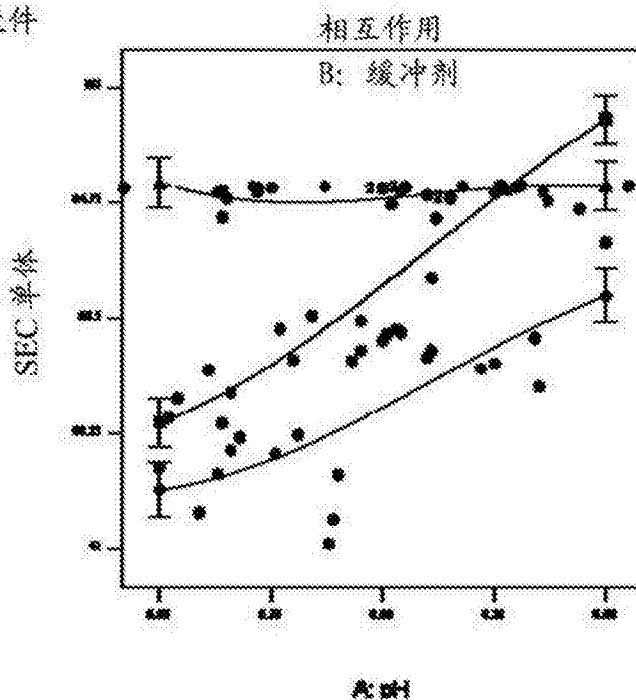


图15

Design-Expert 软件

cHIF 主峰

● 设计点

■ B1 乙酸盐

■ B2 琥珀酸盐

■ B3 组氨酸

X1 = 浓度

X2 = B: 缓冲剂

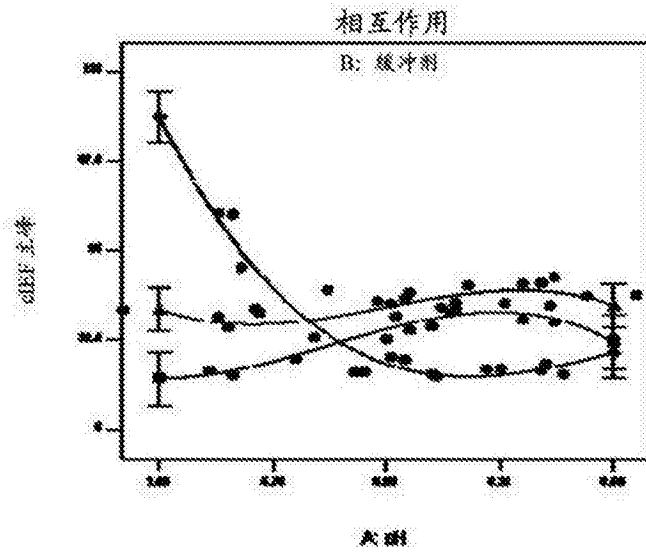


图16

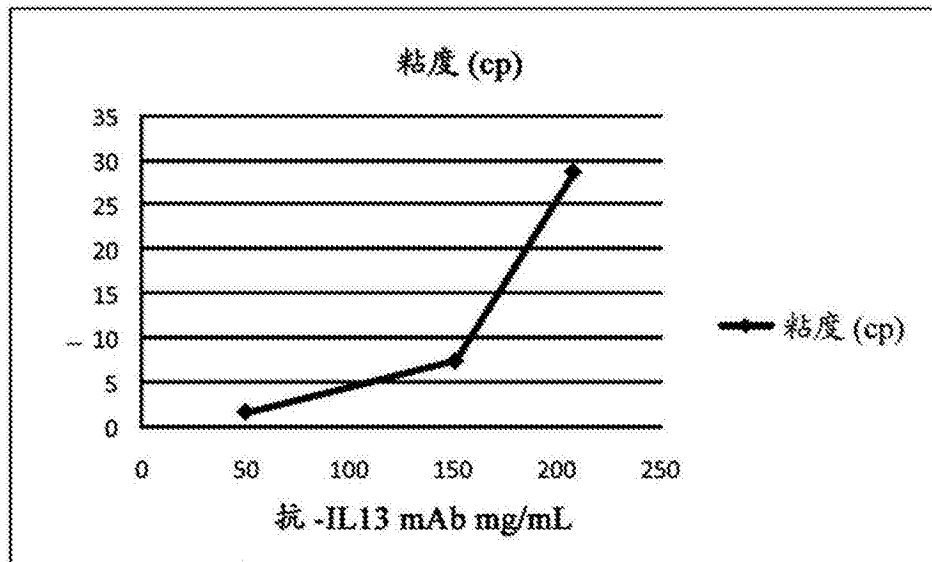
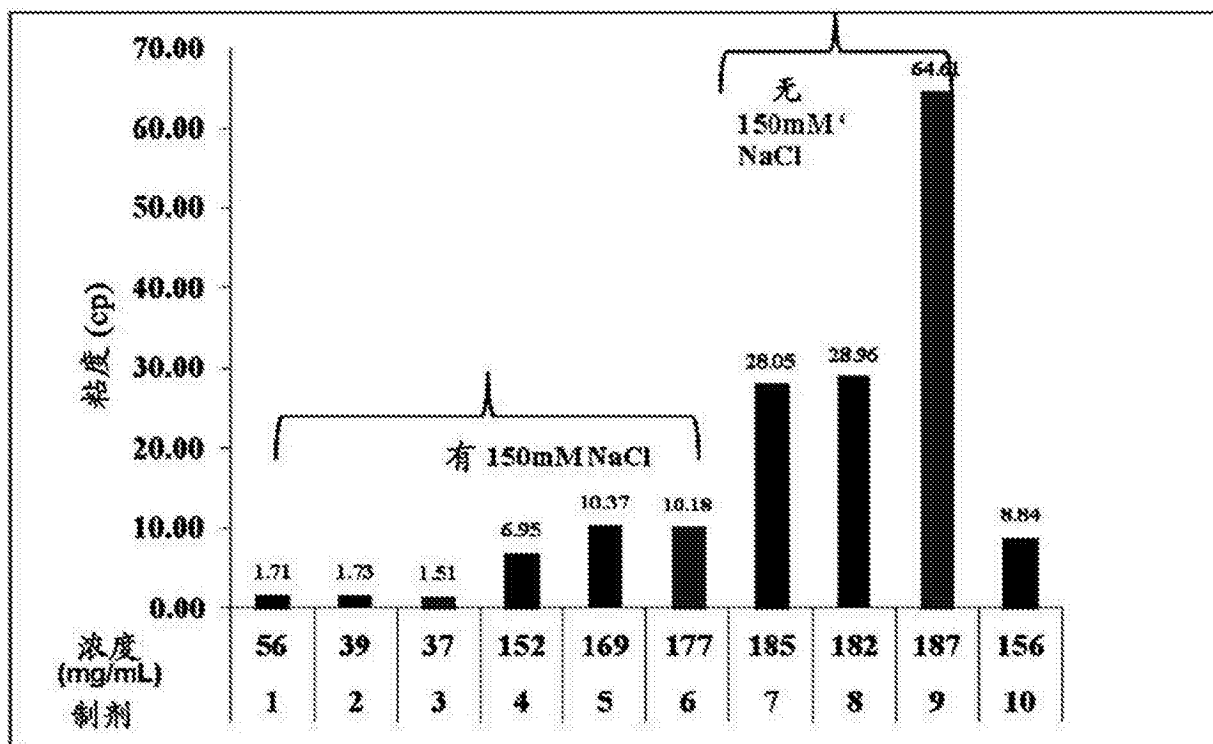


图17



黑色 - 乙酸盐
 灰色 - 琥珀酸盐
 浅灰色 - 组氨酸

图18

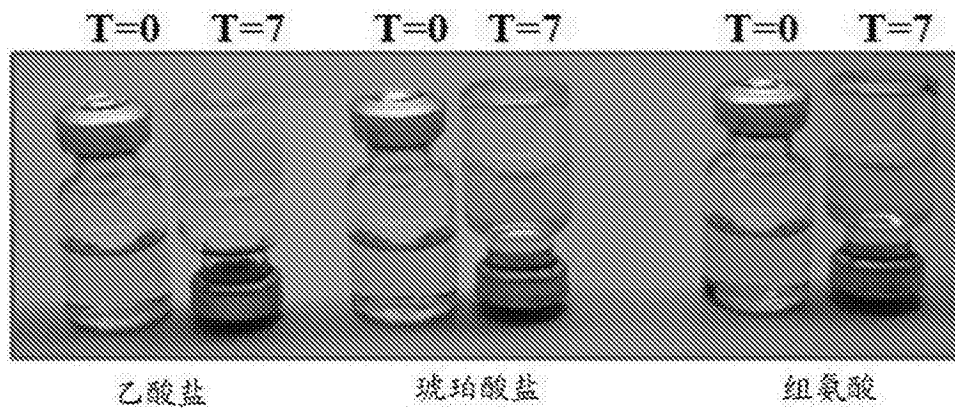


图19

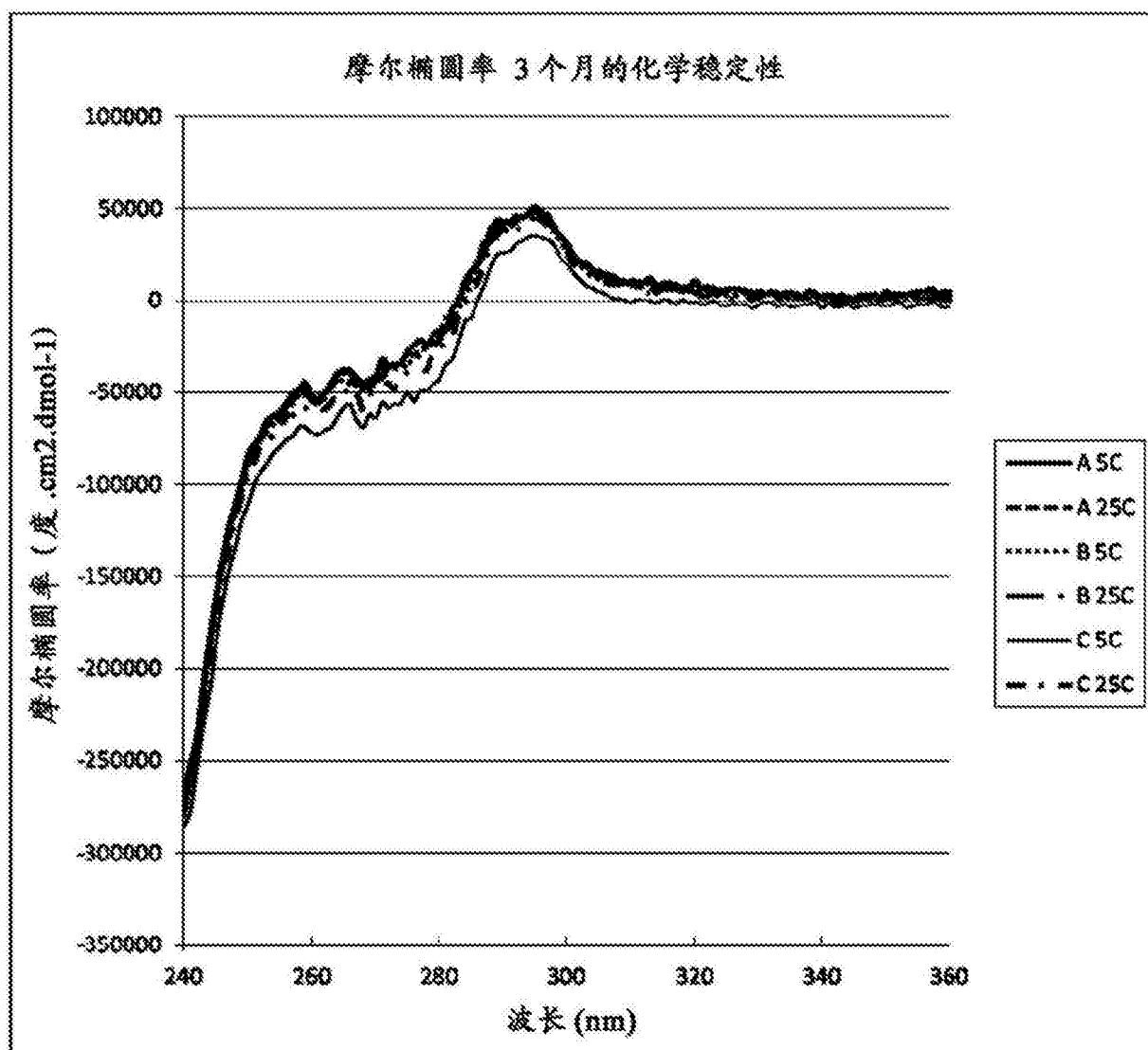


图20