(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119013044 A
(43)申请公布日 2024.11.22

(21)申请号 202380033675.3
(22)申请日 2023.04.12
(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/086868 2022.04.14 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/087860 2023.04.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/198115 EN 2023.10.19
(71)申请人 百济神州瑞士有限责任公司
地址 瑞士巴塞尔阿申格拉本27号,4051
(72)发明人 吴俊 靳孝庆 季宇 顾苏芳 沈健 邱波
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 陈桉
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/18(2006.01)
A61K 47/26(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61K 47/10(2006.01)
A61K 9/08(2006.01)
A61K 47/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书24页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

含有PD-1抗体的稳定高浓度氯化钠配制品及其使用方法

(57)摘要

本发明总体涉及针对人类程序性死亡受体PD-1的抗体或其抗原结合片段的药物配制品的领域。这些配制品可以进一步含有组氨酸缓冲液、无机盐、糖多元醇、和非离子型表面活性剂。本发明的药物配制品在经受热和其他物理应力后展现出低粘度和相当程度的抗体稳定性。还提供了制备这样的抗体配制品的方法以及使用这样的抗体配制品的方法。

CN 119013044 A

1.一种低粘度药物配制品,其包含:

约10mg/mL至约200mg/mL的抗程序性死亡受体1(PD-1)抗体,或其抗原结合片段;

配制缓冲液,该配制缓冲液提供为约5.0至约7.0的pH;

糖多元醇;

降粘剂;以及

非离子型表面活性剂,

其中该药物配制品的粘度不超过30cP,且渗量为约200m0smol/kg至约400m0smol/kg。

2.如权利要求1所述的配制品,其中该PD-1抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含:(a)SEQ ID NO:1的HCDR1(重链互补决定区1)、(b)SEQ ID NO:2的HCDR2、(c)SEQ ID NO:3的HCDR3,该轻链可变区包含:(d)SEQ ID NO:4的LCDR1(轻链互补决定区1)、(e)SEQ ID NO:5的LCDR2、以及(f)SEQ ID NO:6的LCDR3。

3.如权利要求2所述的配制品,其中该配制缓冲液选自由以下组成的组:组氨酸、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、磷酸盐、组氨酸和乙酸的混合物、或组氨酸和柠檬酸的混合物。

4.如权利要求3所述的配制品,其中该配制缓冲液是组氨酸。

5.如权利要求4所述的配制品,其中该缓冲液的浓度是15mM至25mM。

6.如权利要求5所述的配制品,其中该配制品包含20mM组氨酸缓冲液。

7.如权利要求5或6所述的配制品,其中该pH是5.5-6.0。

8.如权利要求1至7中任一项所述的配制品,其中该糖多元醇选自由以下组成的组:海藻糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、麦芽糖、右旋糖酐、或(2-羟基丙基)-β-环糊精。

9.如权利要求8所述的配制品,其中该糖多元醇是海藻糖。

10.如权利要求1至9中任一项所述的配制品,其中该海藻糖浓度是70mM至240mM。

11.如权利要求10所述的配制品,其中该海藻糖浓度是80mM至160mM。

12.如权利要求10所述的配制品,其中该海藻糖浓度是70mM至100mM。

13.如权利要求12所述的配制品,其中该海藻糖浓度是80mM。

14.如权利要求1-13中任一项所述的配制品,其中该降粘剂是选自由以下组成的组的无机盐:氯化钠、氯化镁、氯化钙、乙酸钠、硫酸钠、氯化铵或硫酸铵。

15.如权利要求14所述的配制品,其中该无机盐是浓度为50mM至150mM的氯化钠。

16.如权利要求15所述的配制品,其中该氯化钠的浓度为50mM至100mM。

17.如权利要求16所述的配制品,其中该氯化钠浓度是70mM。

18.如权利要求1-17中任一项所述的配制品,其中该非离子型表面活性剂选自由以下组成的组:聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80或泊洛沙姆188。

19.如权利要求18所述的配制品,其中该聚山梨醇酯20的浓度是0.02%至0.08%。

20.如权利要求19所述的配制品,其中聚山梨醇酯20浓度是0.08%。

21.如权利要求1所述的配制品,其中该配制品包含20mM组氨酸-组氨酸HCl、100mM NaCl、70mM海藻糖和0.08%聚山梨醇酯20,其pH为pH6.0。

22.如权利要求1所述的配制品,其中该配制品包含20mM组氨酸-组氨酸HCl、50mM NaCl、100mM海藻糖和0.02%聚山梨醇酯20,其pH为pH6.0。

23.如权利要求1所述的配制品,其中该配制品包含20mM组氨酸-组氨酸HCl、70mM NaCl、80mM海藻糖和0.08%聚山梨醇酯20,其pH为pH6.0。

24.如权利要求1至23中任一项所述的配制品,其中该抗人PD-1抗体、或其抗原结合片段的浓度是约100mg/mL至200mg/mL。

25.一种制备抗体配制品的方法,该方法包括:

a.将海藻糖和氯化钠添加至该抗体中以获得海藻糖的浓度不低于50mM且氯化钠的浓度不低于25mM的抗体配制品,其中该抗体包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含:(a)SEQ ID NO:1的HCDR1(重链互补决定区1)、(b)SEQ ID NO:2的HCDR2、(c)SEQ ID NO:3的HCDR3,该轻链可变区包含:(d)SEQ ID NO:4的LCDR1(轻链互补决定区1)、(e)SEQ ID NO:5的LCDR2、以及(f)SEQ ID NO:6的LCDR3;

b.将(a)的该抗体配制品浓缩为150-200mg/mL;以及

c.将聚山梨醇酯20添加至(b)的该抗体配制品中以获得聚山梨醇酯20浓度不低于0.01mg/mL的抗体配制品,

其中(c)的该抗体配制品是在水溶液中并且在25℃下粘度不超过30cP,并且其中(c)的该抗体配制品在搅拌、冻融和热应力后是稳定的。

26.一种用于治疗有需要的人类患者的癌症的方法,该方法包括皮下施用有效量的如权利要求1所述的抗人PD-1抗体配制品。

27.如权利要求26所述的方法,其中以约100mg至约1000mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

28.如权利要求27所述的方法,其中以200mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

29.如权利要求27所述的方法,其中以300mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

30.如权利要求27所述的方法,其中以400mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

31.如权利要求27所述的方法,其中以500mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

32.如权利要求27所述的方法,其中每周一次皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

33.如权利要求27所述的方法,其中每2周一次皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

34.如权利要求27所述的方法,其中每3周一次皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

35.如权利要求26所述的方法,其中该癌症是肺癌(包括小细胞肺癌、或非小细胞肺癌)、肾上腺癌、肝癌、胃部癌、宫颈癌、黑色素瘤、肾癌、乳腺癌、结直肠癌、白血病、膀胱癌、骨癌、脑癌、子宫内膜癌、头颈癌、淋巴瘤、卵巢癌、皮肤癌、甲状腺瘤、或食管癌。

36.如权利要求26所述的方法,其中将至少一种其他治疗剂施用于该人类患者。

37.如权利要求36所述的方法,其中该至少一种其他治疗剂是泽布替尼、帕米帕利、抗CTLA4抗体、抗4-1BB抗体、抗OX40抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体、第二PD-1抗体、CD40激动剂、TLR激动剂、CAR-T细胞、或化学治疗剂。

含有PD-1抗体的稳定高浓度氯化钠配制品及其使用方法

技术领域

[0001] 本文披露了稳定的高浓度配制品,其包含与人类程序性死亡受体1(PD-1)结合的抗体或其抗原结合片段。本文还披露了制备这些配制品以及用本披露的配制品治疗癌症的方法。

背景技术

[0002] 抗体作为治疗剂在临床上的使用有所增加。然而,虽然抗体通常具有相似的结构,但它们在一级氨基酸序列上是不同的,即使对于与同一靶蛋白结合的抗体也是如此。抗体的一级氨基酸序列的特征是抗体在不同配制品中的溶解度和/或稳定性特性的主要决定因素之一。为一种抗体提供溶解度和稳定性的抗体配制品对另一种抗体可能表现不佳,导致抗体沉淀或片段化。当需要皮下抗体配制品时尤其如此。

[0003] 由于皮下注射为患者提供自我施用的潜力,使皮下注射在蛋白质治疗剂的递送方面受到越来越多地关注。通过快速、低体积的注射,患者可以在不需要静脉内输注的情况下施用抗体治疗剂,而静脉内输注典型地需要去医院就诊。然而,许多抗体需要一定的剂量才能有效,通常需要将抗体浓缩成小体积。皮下施用途径的体积限制是皮下施用需要考虑的关键因素,导致需要高浓度抗体剂量。反过来,这又产生了与蛋白质的溶解度,物理和化学稳定性以及皮下抗体配制品的制造、储存和递送困难相关的挑战。例如,抗体在加工和/或储存期间会失去溶解度并在某些配制品中形成颗粒,这使得皮下施用效果较差。由于抗体在皮下配制品中的浓缩性质,高粘度是另一个需要克服的问题,因为它限制了产品的可注射性。此外,在制造过程中,高粘性抗体配制品在加工中存在困难,特别是在超滤和无菌过滤中。最后,皮下抗体配制品需要维持抗体的结构和功能。导致蛋白水解或抗体结构降解的皮下抗体配制品将降低功效,以及损害抗体与其靶蛋白结合的能力。

[0004] 因此,长期以来,本领域一直需要用于治疗各种癌症和传染性疾病的抗人PD-1抗体的皮下抗体配制品。此类配制品可以具有良好的抗体溶解度、稳定性、长保质期,并且易于在高浓度下施用。

发明内容

[0005] 本披露提供了稳定的、低粘度且高浓度的抗体配制品。一种低粘度药物配制品,其包含:

约10mg/mL至约200mg/mL的抗程序性死亡受体1(PD-1)抗体,或其抗原结合片段;

配制缓冲液,该配制缓冲液提供为约5.0至约7.0的pH;

糖多元醇;

降粘剂;以及

非离子型表面活性剂,

其中该药物配制品的粘度不超过30cP,且渗量为约200mOsmol/kg至约400mOsmol/kg。

[0006] 该配制品,其中该PD-1抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含:(a)SEQ ID NO:1的HCDR1(重链互补决定区1)、(b)SEQ ID NO:2的HCDR2、(c)SEQ ID NO:3的HCDR3,该轻链可变区包含:(d)SEQ ID NO:4的LCDR1(轻链互补决定区1)、(e)SEQ ID NO:5的LCDR2、以及(f)SEQ ID NO:6的LCDR3。

[0007] 该配制品,其中该配制缓冲液选自由以下组成的组:组氨酸、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、磷酸盐、组氨酸和乙酸的混合物、或组氨酸和柠檬酸的混合物。

[0008] 该配制品,其中该配制缓冲液是组氨酸。

[0009] 该配制品,其中缓冲液的浓度是15mM至25mM。

[0010] 该配制品,其中该配制品包含20mM组氨酸缓冲液。

[0011] 该配制品,其中该pH是5.5-6.0。

[0012] 该配制品,其中该糖多元醇选自由以下组成的组:海藻糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、麦芽糖、右旋糖酐、或(2-羟基丙基)-β-环糊精。

[0013] 该配制品,其中该糖多元醇是海藻糖。

[0014] 该配制品,其中该海藻糖浓度是70mM至240mM。

[0015] 该配制品,其中该海藻糖浓度是80mM至160mM。

[0016] 该配制品,其中该海藻糖浓度是70mM至100mM。

[0017] 该配制品,其中该海藻糖浓度是80mM。

[0018] 该配制品,其中该降粘剂是选自由以下组成的组的无机盐:氯化钠、氯化镁、氯化钙、乙酸钠、硫酸钠、氯化铵或硫酸铵。

[0019] 该配制品,其中该无机盐是浓度为50mM至150mM的氯化钠,

[0020] 该配制品,其中该氯化钠的浓度为50mM至100mM。

[0021] 该配制品,其中该氯化钠浓度是70mM。

[0022] 该配制品,其中该非离子型表面活性剂选自由以下组成的组:聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80或泊洛沙姆188。

[0023] 该配制品,其中该聚山梨醇酯20的浓度是0.02%至0.08%。

[0024] 该配制品,其中聚山梨醇酯20浓度是0.08%。

[0025] 该配制品,其中该配制品包含20mM组氨酸-组氨酸HCl、100mM NaCl、70mM海藻糖和0.08%聚山梨醇酯20,其pH为pH6.0。

[0026] 该配制品,其中该配制品包含20mM组氨酸-组氨酸HCl、50mM NaCl、100mM海藻糖和0.02%聚山梨醇酯20,其pH为pH6.0。

[0027] 该配制品,其中该配制品包含20mM组氨酸-组氨酸HCl、70mM NaCl、80mM海藻糖和0.08%聚山梨醇酯20,其pH为pH6.0。

[0028] 该配制品,其中该抗人PD-1抗体、或其抗原结合片段的浓度是约10mg/mL至200mg/mL。

[0029] 一种制备抗体配制品的方法,该方法包括:

a.将海藻糖和氯化钠添加至该抗体中以获得海藻糖的浓度不低于50mM且氯化钠的浓度不低于25mM的抗体配制品,其中该抗体包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含:(a)SEQ ID NO:1的HCDR1(重链互补决定区1)、(b)SEQ ID NO:2的HCDR2、(c)SEQ ID NO:3的HCDR3,该轻链可变区包含:(d)SEQ ID NO:4的LCDR1(轻链互补决定区1)、(e)SEQ ID

NO:5的LCDR2、以及(f)SEQ ID NO:6的LCDR3;

b.将(a)的该抗体配制品浓缩为150-200mg/mL;以及

c.将聚山梨醇酯20添加至(b)的该抗体配制品中以获得聚山梨醇酯20浓度不低于0.01mg/mL的抗体配制品,

其中(c)的该抗体配制品是在水溶液中并且在25℃下粘度不超过30cP,并且其中(c)的该抗体配制品在搅拌、冻融和热应力后是稳定的。

[0030] 一种用于治疗有需要的人类患者的癌症的方法,该方法包括皮下施用有效量的抗人PD-1抗体配制品。

[0031] 该方法,其中以约100mg至约1000mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

[0032] 该方法,其中以200mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

[0033] 该方法,其中以300mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

[0034] 该方法,其中以400mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

[0035] 该方法,其中以500mg的剂量皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

[0036] 该方法,其中每周一次皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

[0037] 该方法,其中每2周一次皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

[0038] 该方法,其中每3周一次皮下施用该抗人PD-1抗体配制品。

[0039] 该方法,其中该癌症是肺癌(包括小细胞肺癌、或非小细胞肺癌)、肾上腺癌、肝癌、胃部癌、宫颈癌、黑色素瘤、肾癌、乳腺癌、结直肠癌、白血病、膀胱癌、骨癌、脑癌、子宫内膜癌、头颈癌、淋巴瘤、卵巢癌、皮肤癌、甲状腺瘤、或食管癌。

[0040] 该方法,其中将至少一种其他治疗剂施用于该人类患者,该其他治疗剂是泽布替尼、帕米帕利、抗CTLA4抗体、抗4-1BB抗体、抗OX40抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体、CD40激动剂、TLR激动剂、CAR-T细胞、或化学治疗剂。

[0041] 在一些实施例中,抗体配制品包含抗PD-1抗体、或其抗原结合片段、配制缓冲液、糖多元醇、降粘剂、和非离子型表面活性剂。在一些实施例中,配制缓冲液提供在5.0和7.0之间的pH范围。在一些实施例中,抗体配制品的粘度不超过30厘泊(cP)。在一些实施例中,抗体配制品的渗量为约200m0smol/kg至约400m0smol/kg。在一些实施例中,抗体配制品在搅拌、冻融和热应力后是稳定的。

[0042] 在一些实施例中,抗体配制品可以包含在约10mg/mL至约200mg/mL之间的抗PD-1抗体或其抗原结合片段、配制缓冲液、糖多元醇、降粘剂、和非离子型表面活性剂,并且pH为约6.0±0.5。在一些实施例中,抗体配制品可以基本上由以下组成:约100mg/mL至约180mg/mL的抗PD-1抗体、配制缓冲液、糖多元醇、降粘剂、和非离子型表面活性剂,并且pH为约6.0±0.5。

[0043] 在一些实施例中,配制缓冲液选自由以下组成的组:组氨酸、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、磷酸盐、组氨酸和乙酸的混合物、组氨酸和柠檬酸的混合物。在一些实施例中,配制缓冲液可以是组氨酸缓冲液。在一些实施例中,组氨酸缓冲液的浓度是约10mM至约30mM。在一些实施例中,组氨酸缓冲液的浓度是约20mM组氨酸。

[0044] 在一些实施例中,糖多元醇选自由以下组成的组:海藻糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、麦芽糖、右旋糖酐、或(2-羟基丙基)-β-环糊精。在一些实施例中,糖多元醇可以是海藻糖。在一些实施例中,海藻糖是α,α-海藻糖二水合物。在其他实施例中,糖多元醇可以是蔗糖。

在一些实施例中,糖多元醇的浓度可以是约25mM至约240mM。在一些实施例中,糖多元醇的浓度可以是约50mM至约150mM,优选地约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、或约100mM。

[0045] 在一些实施例中,降粘剂是无机盐。在一些实施例中,降粘剂选自由以下组成的组:氯化钠、氯化镁、氯化钙、乙酸钠、硫酸钠、氯化铵或硫酸铵。在一些实施例中,降粘剂是氯化钠。在一些实施例中,氯化钠的浓度可以是约25mM至约150mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、或约100mM。

[0046] 在一些实施例中,非离子型表面活性剂选自由以下组成的组:聚山梨醇酯80(PS80)、聚山梨醇酯20(PS20)或泊洛沙姆188。在一些实施例中,非离子型表面活性剂的浓度可以是约0.01至约1mg/mL。在一些实施例中,聚山梨醇酯的浓度是约0.2mg/mL、约0.3mg/mL、约0.4mg/mL、约0.5mg/mL、约0.6mg/mL、约0.7mg/mL、或约0.8mg/mL。在一些实施例中,聚山梨醇酯是聚山梨醇酯20。

[0047] 在一些实施例中,抗体配制品包含约100mg/mL、约105mg/mL、约110mg/mL、约115mg/mL、约120mg/mL、约125mg/mL、约130mg/mL、约135mg/mL、约140mg/mL、约145mg/mL、约150mg/mL、约155mg/mL、约160mg/mL、约165mg/mL、约170mg/mL、约175mg/mL、约180mg/mL、约185mg/mL、约190mg/mL、约195mg/mL或约200mg/mL的抗PD-1抗体、或其抗原结合片段,约20mM组氨酸缓冲液,约70mM至约100mMα,α-海藻糖二水合物或蔗糖,约50mM至约100mM氯化钠,约0.2mg/mL至约0.8mg/mL聚山梨醇酯20,并且抗体配制品的pH为6.0±0.5。在一些实施例中,抗体配制品的粘度在25℃下不超过30cP。

[0048] 在本发明的一些实施例中,抗PD-1抗体是替雷利珠单抗(BGB-A317)或替雷利珠单抗的抗原结合片段。

[0049] 本文还提供了制备稳定的、低粘度抗体配制品的方法,该方法包括:将海藻糖或蔗糖和氯化钠添加至该抗体中以获得海藻糖或蔗糖的浓度不低于50mM且氯化钠的浓度不低于25mM的抗体配制品,将该抗体浓缩至约200mg/mL;将聚山梨醇酯20添加至该抗体配制品中以获得包含浓度不低于0.01mg/mL的聚山梨醇酯20的抗体配制品。其中该抗体配制品是水溶液,并且在25℃下粘度不超过30cP。

[0050] 本文还提供了治疗患有癌症的人类患者的癌症的方法,该方法包括向该患者皮下施用有效量的如本文所述的PD-1抗体配制品。

[0051] 本文提供了治疗患有表达PDL-1的癌症的人类患者的癌症的方法,该方法包括向该患者皮下施用有效量的如本文所述的PD-1抗体配制品。

附图说明

[0052] 图1示出了在40℃下储存2周(图中表示为“40C2W”)以及暴露于光2周(图中表示为“pho2W”)的10mg/ml替雷利珠单抗配制品的SEC-HPLC研究(图1A)和CZE研究(图1B)的结果。T0是指样品的初始点。

[0053] 图2A-B示出了如通过SEC-HPLC测量的在冻融(图中表示为“3FT”)、振荡(图中表示为“SK”)和热应力(图中表示为“40C4W”)后每种配制品的聚集体(图2A)和单体(图2B)的量。T0是指样品的初始点。“25C6M”指示配制品在25℃下储存6个月。“5C6M”指示配制品在5℃下储存6个月。

[0054] 图3示出了在40℃下储存4周时间段(图中表示为“40C4W”)的皮下抗体配制品的CZE研究的结果。T0是指初始时间点。“25C6M”指示配制品在25℃下储存6个月。“5C6M”指示配制品在5℃下储存6个月。

[0055] 图4示出了如通过CE-SDS在非还原条件下测量的配制品在40℃下在4周时间段内(图中表示为“40C4W”)的纯度。T0是指初始时间点。“25C6M”指示配制品在25℃下储存6个月。“5C6M”指示配制品在5℃下储存6个月。

[0056] 图5示出了在25℃(表示为“25C”)和5℃±3℃(表示为“5C”)条件下储存的配制品F18的SEC-HPLC研究(图5A和图5B)、CZE研究(图5C)和CE-SDS(NR)研究(图5D)的结果。“0”个月是指样品的初始时间点。

[0057] 图6A-B示出了F18皮下配制品在Sprague Dawley大鼠模型中的生物利用度的数据。

[0058] 图7示出了F18皮下配制品在猴模型中的生物利用度数据。

[0059] 图8是显示当在动物的不同部位施用皮下配制品时,大鼠和小型猪两者都没有注射部位反应的照片。

具体实施方式

定义

[0060] 除非在本文件的其他地方明确定义,否则本文所用的所有其他技术和科学术语具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0061] 如本文使用的,包括所附权利要求,例如“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“该”的单数形式包括它们相应的复数指代,除非上下文另外明确说明。

[0062] 除非上下文明确地指示其他的情况,否则术语“或”用于意指术语“和/或”并且与之互换使用。

[0063] 贯穿本说明书和以下权利要求,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”以及变化形式如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”将理解为隐含包括所陈述的氨基酸序列、DNA序列、其步骤或组,但不排除任何其他氨基酸序列、DNA序列、步骤。当在本文中使用时,术语“包含”可以用术语“含有(containing)”、“包括(including)”、或有时用“具有(having)”取代。

[0064] 本文中的术语“施用(administration/administering)”和“治疗(treating/treatment)”,当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,意指外源性药物、治疗剂、诊断剂、或抗体配制品与该动物、人、受试者、细胞、组织、器官、或生物流体接触。细胞的处理涵盖试剂与细胞的接触以及试剂与流体的接触,其中流体与细胞接触。术语“施用”和“治疗”也指体外和离体处理,例如,通过试剂、诊断剂、结合化合物或通过另一种细胞对细胞进行处理。本文的术语“受试者”包括任何生物体,优选动物,更优选哺乳动物(例如大鼠、小鼠、狗、猫、兔),并且最优选人。在一方面,治疗任何疾病或障碍是指改善该疾病或障碍(即,减缓或阻止或减少疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一方面,“治疗(treat,treating或treatment)”是指缓解或改善至少一个身体参数,包括患者可能无法辨别的那些。在又另一方面,“治疗(treat,treating或treatment)”是指在身体上(例如,可辨别症状的稳定化)、在生理上(例如,身体参数的稳定化)或两者上调节疾病或障碍。

[0065] 如本文所用的术语“治疗有效量”是指当施用于受试者以治疗疾病、或疾病或障碍的至少一种临床症状时,足以影响该疾病、障碍或症状的治疗的抗PD-1抗体的量。“治疗有效量”可以随药剂,疾病,障碍,和/或疾病或障碍的症状,疾病、障碍、和/或疾病或障碍的症状的严重程度,待治疗的受试者的年龄,和/或待治疗的受试者的体重而变化。在任何给定情况下的适当量对于本领域技术人员而言是显而易见的,或者可以通过常规实验确定。在组合疗法的情况下,“治疗有效量”是指用于有效治疗疾病、障碍或病症的组合对象的总量。在本披露的一些实施例中,该受试者是人。

[0066] “药物配制品”或“配制品”是指抗体制剂,该制剂的形式允许活性成分有效,并且其不含对被施用该配制品的受试者有毒的另外组分。

[0067] “稳定的”配制品是以使得抗体的物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性随时间推移得以保持的方式制备的抗体的配制品。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术可在本领域中获得并且在以下的文献中做了综述:Peptide and Protein Drug Delivery[肽和蛋白质药物递送],247-301,Vincent Lee编辑,Marcel Dekker,Inc.[马塞尔·德克尔公司],纽约市,纽约州,出版于(1991)和Jones,A.Adv.Drug Delivery Rev.[先进药物递送评论]10:29-90(1993)。可以在选定的时间段内在选定的温度下测量稳定性。

[0068] 本文术语“抗体”以最广义使用并且特别地涵盖抗体(包括全长单克隆抗体)和抗体片段,只要它们识别抗原,例如PD-1。抗体通常是单特异性的,但是还可以描述为不同特异性的、异特异性的、或多特异性的。抗体分子通过特异性结合位点与抗原上的特定性抗原决定簇或表位结合。

[0069] 本文中的术语“单克隆抗体”或“mAb”或“Mab”是指基本上同质的抗体的群体,即,除了可能少量存在的可能天然发生的突变外,该群体中包含的抗体分子在氨基酸序列上是相同的。相比之下,常规(多克隆)抗体制剂典型地包括在其可变结构域中具有不同氨基酸序列的多种不同抗体,特别地其互补决定区(CDR),它们通常对不同的表位具有特异性。修饰语“单克隆”指示获得自基本上均质的抗体群体的抗体的特征并且不应理解为要求通过任何特定方法产生抗体。可以通过本领域技术人员已知的方法获得单克隆抗体(mAb)。参见,例如Kohler G等人,Nature[自然]1975 256:495-497;美国专利号4,376,110;Ausubel FM等人,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY[分子生物学现代方法]1992;Harlow E等人,ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL[抗体:实验室手册],Cold spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室]1988;以及Colligan JE等人,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY[免疫学现代方法]1993。本文披露的mAb可以是任何免疫球蛋白类,包括IgG、IgM、IgD、IgE、IgA及其任何亚类。产生mAb的杂交瘤可以在体外或在体内培养。高效价的mAb可以通过体内产生获得,其中将来自单个杂交瘤的细胞腹膜内注射到小鼠中,例如原始引发的Balb/c小鼠,以产生含有高浓度所需mAb的腹水。可以使用本领域技术人员熟知的柱层析方法从这样的腹水,或从培养上清液中纯化同种型IgM或IgG的MAb。

[0070] 通常,基本抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每对具有一条“轻链”(约25kDa)和一条“重链”(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110或更多个氨基酸的可变区。重链的羧基末端部分可以定义为主要负责效应子功能的恒定区。典型地,人轻链被分类为κ和λ轻链。此外,人重链典型地分类为α、δ、ε、γ或μ,并且分别将抗体的同种型定义为IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。在轻链和重链内,

可变区和恒定区通过约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包括约10个以上氨基酸的“D”区。

[0071] 每个轻链/重链(VL/VH)对的可变区形成抗体结合位点。因此,一般而言,完整抗体具有两个结合位点。除了双功能或双特异性抗体外,一般而言两个结合位点是相同的。

[0072] 典型地,重链和轻链两者的可变结构域包含三个高变区,也称为“互补决定区(CDR)”,其位于相对保守的框架区(FR)之间。CDR通常由框架区对齐,使得能够结合特异性表位。一般而言,从N末端到C末端,轻链和重链可变结构域两者按顺序都包含FR-1(或FR1)、CDR-1(或CDR1)、FR-2(FR2)、CDR-2(CDR2)、FR-3(或FR3)、CDR-3(CDR3)和FR-4(或FR4)。通常,每个结构域的氨基酸分配符合免疫学上感兴趣的蛋白质序列的定义,Kabat等人,National Institutes of Health[美国国立卫生研究院],贝塞斯达,马里兰州;第5版;NIH公开号91-3242(1991);Kabat(1978)Adv.Prot.Chem.[高级防护化学]32:1-75;Kabat等人,(1977)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]252:6609-6616;Chothia等人,(1987)J Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917或Chothia等人,(1989)Nature[自然]342:878-883。

[0073] 术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“CDR”(即,轻链可变结构域中的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3以及重链可变结构域中的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3)的氨基酸残基。参见Kabat等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学上感兴趣的蛋白质序列],第5版Public Health Service[公共卫生署],National Institutes of Health[美国国立卫生研究院],贝塞斯达,马里兰州(通过序列定义抗体的CDR区);还参见Chothia和Lesk(1987)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917(通过结构定义抗体的CDR区)。术语“框架”或“FR”残基意指除了本文定义为CDR残基的高变区残基之外的那些可变结构域残基。

[0074] 除非另外说明,“抗体片段”或“抗原结合片段”是指抗体的抗原结合片段,即保留与全长抗体结合的抗原特异性结合的能力的抗体片段,例如保留一个或多个CDR区的片段。抗原结合片段的实例包括但不限于Fab、Fab’、F(ab’)2和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,单链Fv(ScFv));纳米抗体以及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0075] 与特定靶蛋白特异性结合的抗体也被描述为与特定靶蛋白特异性结合。这意指与其他蛋白相比,抗体表现出优先结合靶蛋白,但这种特异性不需要绝对的结合特异性。如果抗体的结合决定了样品中靶蛋白的存在,例如,没有产生不希望的结果,如假阳性,则抗体被认为是对其预期靶标为“特异性的”。可用于本发明的抗体或其结合片段会以比非靶蛋白的亲和力高至少两倍,优选高至少10倍,更优选高至少20倍,和最优选高至少100倍的亲和力结合至靶蛋白。将本文的抗体称作与包含给定氨基酸序列的多肽特异性结合。

[0076] 本文中的术语“人抗体”意指仅包含人免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如果在小鼠、小鼠细胞或源自小鼠细胞的杂交瘤中产生,人抗体可以含有鼠碳水化合物链。类似地,“小鼠抗体”或“大鼠抗体”意指分别仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。

[0077] 术语“人源化抗体”意指含有来自非人(例如鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。此类抗体含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。通常,人源化抗体将包含基本上至少一个、并且典型地两个可变结构域的全部,其高变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的那些,并且FR区的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地是人免疫球蛋白的至少一部分。

当有必要区分人源化抗体与亲本啮齿动物抗体时,将前缀“hum”、“hu”、“Hu”或“h”添加到抗体克隆名称中。人源化形式的啮齿动物抗体会通常包含亲本啮齿动物抗体的相同CDR序列,但是可包括某些氨基酸取代以增加亲和力,增加人源化抗体的稳定性,或出于其他原因。

[0078] 本申请的抗体在治疗癌症中具有潜在治疗用途。本文的术语“癌症”或“肿瘤”意指或描述哺乳动物的特征典型地为细胞生长失调的生理病症。癌症的实例包括但不限于肺癌(包括小细胞肺癌、或非小细胞肺癌)、肾上腺癌、肝癌、胃部癌、宫颈癌、黑色素瘤、肾癌、乳腺癌、结直肠癌、白血病、膀胱癌、骨癌、脑癌、子宫内膜癌、头颈癌、淋巴瘤、卵巢癌、皮肤癌、甲状腺瘤、或食管癌。

[0079] 此外,本申请的抗体在控制病毒感染和其他人类疾病中具有潜在的治疗用途,这些疾病在机理上涉及免疫耐受或“耗尽”。在本申请的上下文中,术语“耗尽”是指导致免疫细胞对癌症或慢性病毒感染的反应能力减弱的过程。

抗-PD-1抗体

[0080] 本披露提供了抗PD-1抗体及其皮下配制品。例如,替雷利珠单抗(BGB-A317)是披露于美国专利号8,735,553的具有在下表1中提供的序列的抗PD-1抗体。

表1

替雷利珠单抗（BGB-A317）		
结构域	**SEQ ID NO:**	**氨基酸序列**
HCDR1	SEQ ID NO:1	GFSLTSYGVH
HCDR2	SEQ ID NO:2	VIYADGSTNYNPSLKS
HCDR3	SEQ ID NO:3	ARAYGNYWYIDV
LCDR1	SEQ ID NO:4	KSSESVSNDVA
LCDR2	SEQ ID NO:5	YAFHRFT
LCDR3	SEQ ID NO:6	HQAYSSPYT
VH	SEQ ID NO:7	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVHW IRQPPGKGLEWIGVIYADGSTNYNPSLKSRVTISKDT SKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARAYGNYWYIDV WGQGTTVTVSS
VL	SEQ ID NO:8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVSNDVAWY QQKPGQPPKLLINYAFHRFTGVPDRFSGSGYGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCHQAYSSPYTFGQGTKLEIK
IgG4恒定结构域	SEQ ID NO:9	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK

		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK
重链	SEQ ID NO:10	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVHW IRQPPGKGLEWIGVIYADGSTNYNPSLKSRVTISKDT SKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARAYGNYWYIDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVAVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK
轻链	SEQ ID NO:11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVSNDVAWY QQKPGQPPKLLINYAFHRFTGVPDRFSGSGYGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCHQAYSSPYTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0081] 抗PD1抗体可包括但不限于替雷利珠单抗、帕博利珠单抗(Pembrolizumab)或纳武利尤单抗(Nivolumab)。替雷利珠单抗披露于US 8,735,553中。由默克公司(Merck)披露于US 8,354,509和US 8,900,587中的帕博利珠单抗(以前称为MK-3475)是人源化lgG4-K免疫球蛋白,其靶向PD1受体并抑制PD1受体配体PD-L1和PD-L2的结合。帕博利珠单抗已被批准用于转移性黑色素瘤和转移性非小细胞肺癌(NSCLC)的适应症,并且正在进行用于治疗头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)和难治性霍奇金淋巴瘤(cHL)的临床研究。纳武利尤单抗(如由百时美施贵宝公司(Bristol-Meyers Squibb)所披露的)是全人lgG4-K单克隆抗体。纳武利尤单抗(克隆5C4)披露于美国专利号US 8,008,449和WO 2006/121168中。纳武利尤单抗被批准用于治疗黑色素瘤、肺癌、肾癌、和霍奇金淋巴瘤。

对Fc区框架的进一步改变

[0082] 在其他方面,通过用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替代一个或多个氨基酸,使得抗体对效应配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应子配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。此方法描述于例如Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中。

[0083] 在另一方面,可以用一个或多个不同的氨基酸残基替代一个或多个氨基酸残基,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低的或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。此方法描述于例如Idusogie等人的美国专利号6,194,551中。

[0084] 在又另一方面,改变一个或多个氨基酸残基从而改变抗体固定补体的能力。该方法描述于例如Bodmer等人的PCT公开WO 94/29351中。在特定的方面,本披露的抗体或其抗原结合片段的一个或多个氨基酸被IgG1亚类和κ同种型的一个或多个同种异型氨基酸残基替代。同种异型氨基酸残基还包括但不限于IgG1、IgG2和IgG3亚类的重链恒定区以及κ同种型的轻链恒定区,如Jefferis等人,MAbs[单克隆抗体]1:332-338(2009)所述。

[0085] 在另一方面,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对Fcγ受体的亲和力。此方法描述于例如Presta的PCT公开WO 00/42072中。此外,已经绘制了在人IgG1上与FcγRI、FcγRII、FcγRIII和FcRn的结合位点,并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见Shields等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]276:6591-6604,2001)。

[0086] 在仍另一方面,抗体的糖基化被修饰。例如,可以制备无糖基化抗体(即,抗体缺乏或具有降低的糖基化)。例如,可以改变糖基化以增加抗体对"抗原"的亲和力。这种碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,其导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。此方法描述于例如Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中。

[0087] 另外地或替代性地,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。已经证明此类改变的糖基化模式增加抗体的ADCC能力。可以通过例如在具有改变的糖基化机构的宿主细胞中表达抗体完成此类糖类修饰。在本领域中已经说明了具有改变的糖基化机构的细胞,并且这些细胞可以用作宿主细胞,在这些宿主细胞中表达重组抗体从而由此产生具有改变的糖基化的抗体。例如,Hang等人的EP 1,176,195描述了具有功能性破坏的FUT8基因的细胞系,其编码岩藻糖基转移酶,使得在这种细胞系中表达的抗体表现出低岩藻糖基化。Presta的PCT公开WO 03/035835描述了变体CHO细胞系、Lecl3细胞,其具有降低的将岩藻糖连接至Asn(297)-连接的碳水化合物的能力,也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见Shields等人,(2002)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开WO 99/54342描述了被工程化以表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如,β(1,4)-N乙酰氨基葡萄糖转移酶III(GnTIII))的细胞系,使得在工程化的细胞系中表达的抗体表现出增加的二等分GlcNac结构,这导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等人,Nat.Biotech.[自然生物技术]17:176-180,1999)。

[0088] 在另一方面,如果所需的ADCC降低,许多先前的报道显示人抗体亚类IgG4仅具有适度的ADCC并且几乎没有CDC效应子功能(Moore G L等人,2010MAbs[单克隆抗体],2:181-189)。另一方面,发现天然IgG4在应激条件下(如在酸性缓冲剂中或在升高的温度下)较不稳定(Angal,S.1993Mol Immunol[分子免疫学],30:105-108;Dall'Acqua,W.等人,1998Biochemistry[生物化学],37:9266-9273;Aalberse等人,2002Immunol[免疫学],105:9-19)。降低的ADCC可以通过将抗体可操作地连接至用具有降低或无效的FcγR结合或C1q

结合活性的改变的组合工程化的IgG4,从而降低或消除ADCC和CDC效应子功能来实现。考虑到抗体作为生物药物的物理化学性质,IgG4的较不期望的固有特性之一是其两条重链在溶液中动态分离以形成半抗体,这导致通过称为“Fab臂交换”的过程在体内产生双特异性抗体(Van der Neut Kolfschoten M等人,2007Science[科学],317:1554-157)。228位(EU编号系统)丝氨酸突变为脯氨酸表现出对IgG4重链分离的抑制作用(Angal,S.1993Mol Immunol[分子免疫学],30:105-108;Aalberse等人,2002Immunol[免疫学],105:9-19)。据报道,铰链区和γFc区中的一些氨基酸残基对抗体与Fcγ受体的相互作用具有影响(Chappel SM等人,1991Proc.Natl.Acad.Sci.USA [美国国家科学院学报],88:9036-9040;Mukherjee,J.等人,1995FASEB J[美国实验生物学学会联合会杂志],9:115-119;Armour,K.L.等人,1999Eur J Immunol[欧洲免疫学杂志],29:2613-2624;Clynes,R.A.等人,2000Nature Medicine[自然医学],6:443-446;Arnold J.N.,2007Annu Rev immunol[免疫学年鉴],25:21-50)。此外,在人群中一些罕见的IgG4同种型也可引起不同的物理化学特性(Brusco,A.等人,1998Eur J Immunogenet[欧洲免疫遗传学杂志],25:349-55;Aalberse等人,2002Immunol[免疫学],105:9-19)。为了产生具有低ADCC、CDC和不稳定性的PD-1抗体,可以修饰人IgG4的铰链区和Fc区并引入许多改变。这些经修饰的IgG4 Fc分子可在SEQ ID NO:83-88,美国专利号8,735,553中找到。

治疗方法

[0089] 本披露的抗体或抗原结合片段可用于多种应用,包括但不限于治疗PD-1相关障碍或疾病的方法。在一方面,PD-1相关障碍或疾病是癌症。

[0090] 在一方面,本披露提供了治疗癌症的方法。在某些方面,该方法包括向有需要的患者施用有效量的抗PD-1抗体或抗原结合片段。癌症可以包括但不限于肺癌(包括小细胞肺癌、或非小细胞肺癌)、肾上腺癌、肝癌、胃部癌、宫颈癌、黑色素瘤、肾癌、乳腺癌、结直肠癌、白血病、膀胱癌、骨癌、脑癌、子宫内膜癌、头颈癌、淋巴瘤、卵巢癌、皮肤癌、甲状腺瘤、或食管癌。

[0091] 本发明的抗体或抗原结合片段可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内,并且如果需要用于局部治疗、病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,如静脉内或皮下注射,这部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑了多种给药方案,包括但不限于单次施用或在不同时间点的多次施用、推注施用、和脉冲输注。

[0092] 本发明的抗体或抗原结合片段可以以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。关于这点要考虑的因素包括治疗的特定障碍、治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、障碍的起因、药剂的递送位点、施用方法、施用方案、和医疗从业者已知的其他因素。抗体不需要但任选地与目前用于预防或治疗所研究的障碍的一种或多种药剂一起配制。此类其他药剂的有效量取决于配制品中存在的抗体的量、障碍或治疗的类型、以及上文讨论的其他因素。这些通常以与如本文所述相同的剂量和施用途径使用,或以本文所述剂量的约1%-99%使用,或以经验/临床确定为合适的任何剂量和任何途径使用。

[0093] 为预防或治疗疾病,本发明的抗体或抗原结合片段的合适的剂量将取决于待治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和病程、施用抗体是用于预防还是治疗目的、先前疗法、患者的临床病史和对抗体的应答、以及主治医生的判断。

[0094] 涉及PD-1的抗体已被证明以各种剂量范围和施用周期施用于人类癌症患者时是安全的。本文披露的皮下抗体配制品可以以100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg或1000mg施用。可以每天两次,每天一次,每周一次,每周两次,每周三次,每周四次,每周五次,每两周一次,每三周一次,每月一次,每两个月一次,每三个月一次,每四个月一次,每五个月一次或每六个月一次施用皮下抗体配制品。在一些实施例中,给药方案包括将替雷利珠单抗以100mg每三周施用一次。在一些实施例中,给药方案包括将替雷利珠单抗以200mg每三周施用一次。在一些实施例中,给药方案包括将替雷利珠单抗以300mg每三周施用一次。在一些实施例中,给药方案包括将替雷利珠单抗以400mg每三周施用一次。在一些实施例中,给药方案包括将替雷利珠单抗以500mg每三周施用一次。在一些实施例中,给药方案包括将替雷利珠单抗以600mg每三周施用一次。

[0095] 在某些实施例中,替雷利珠单抗可以与其他疗法组合施用,例如,泽布替尼、帕米帕利、抗CTLA4抗体、抗4-1BB抗体、抗OX40抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体、CD40激动剂、TLR激动剂、CAR-T细胞、或化学治疗剂。

药物组合物和配制品

[0096] 还提供了包含药物配制品的组合物,这些药物配制品包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,组合物包含与PD-1结合的一种或多种抗体或抗原结合片段。这些组合物可以进一步包含合适的载剂,例如包含缓冲液的药学上可接受的赋形剂。

[0097] 通过将具有所需纯度的这种抗体或抗原结合片段与一种或多种药学上可接受的载剂混合来制备本文所述的抗PD-1抗体或抗原结合片段的药物配制品(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition[雷明顿药物科学第16版],Osol,A.编辑(1980)),呈冻干配制品或水溶液的形式。药学上可接受的载剂在所采用的剂量和浓度下对于接受者通常是无毒性的,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐、和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白络合物);和/或非离子型表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)或聚山梨醇酯20。

[0098] 本披露提供了如本文详细描述的抗PD1抗体的各种药物配制品。例如,配制品可以包含抗PD1抗体、提供一定pH的缓冲液(例如,组氨酸)、糖多元醇(例如,蔗糖或海藻糖)、降粘剂(例如,NaCl)和非离子型表面活性剂(例如,聚山梨醇酯20)。

[0099] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有该抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形制品的形式,例如膜或微胶囊。

[0100] 用于体内施用的配制品通常是无菌的。无菌性可以例如通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

实例

[0101] 实例和某些实施例的描述应被视为是说明性的,而非限制由权利要求所限定的本

发明。如将容易理解的,在不脱离如权利要求所阐述的本发明的情况下,可以使用上文阐述的特征的许多变化和组合。所有这些变化都意图包括在本发明的范围之内。引用的所有参考文献都通过引用以其全文并入本文。

分析方法

[0102] 该方法部分提供了在以下实例1-5中所用方法的总结。

SEC-HPLC

[0103] 在Waters HPLC系统上通过尺寸排阻色谱法(SEC)分析可溶性聚集体的形成。使用等度梯度在维持在37℃±5℃下的TSKgel G3000™ SWXL柱上根据分子大小分离蛋白质。洗脱分子量物质并通过280nm处的UV吸收进行检测。聚集体、单体和片段的分布经由标准品和样品的峰面积来定量。

CZE

[0104] 使用PA800 Plus™(贝克曼公司(Beckman))通过毛细管区带电泳法(CZE)(也称为游离溶液毛细管电泳)测定样品的电荷异质性。样品根据其电泳迁移率进行分离,这些迁移率是由被含有已酸的缓冲溶液填充的毛细管中分析物的电荷和流体动力学半径的差异引起的。当应用外部电场时,样品以其天然状态进行分析,从而产生特定的峰模式,显示抗体的各种电荷变体(酸性、碱性和主电荷变体)。通过压力注射样品,并通过214nm处的UV吸光度检测移动的蛋白。

CE-SDS(NR)

[0105] 使用PA800 Plus™(贝克曼公司)通过毛细管凝胶电泳(CE)方法确定样品的纯度。将样品用十二烷基硫酸钠(SDS)变性,并在填充有凝胶的毛细管中根据大小进行分离,该凝胶充当筛分介质。在非还原(NR)样品中,添加烷基化剂N-乙基马来酰亚胺(NEM)以避免样品制剂诱导的任何片段化,并确保主IgG峰保持完整。电动注射样品,并且使用UV检测器通过200nm处的UV吸光度检测移动的蛋白。非还原样品的可报告值是IgG主峰的时间校正面积百分比(TCA)%。

蛋白质浓度

[0106] 在UV 280nm处测定蛋白质浓度。

粘度

[0107] 抗体配制品的粘度在基于芯片的microVISC™仪器(锐欧森公司(Rheosense))上测量,其中压差与溶液动态粘度相关。样品量是大约70-100μL。将等分试样负载到400μL microVISC™一次性移液管中并且连接到芯片。在500S^{-1}的剪切速率和约25℃的温度下一式三份进行测量。

热稳定性

[0108] 使用Uncle™(Unchained Labs)确定稳定性,该实验室组合了3种不同的测量模式-荧光,静态光散射(SLS)和动态光散射(DLS)。进行SLS和固有荧光分别确定配制品的起始聚集温度(Tagg)和熔融温度(Tm)。

浊度

[0109] 使用96孔板分子装置M2e™读取器测量350nm处的UV吸收作为浊度指示。针对空白孔读数控制吸收读数,并且相对于样品路径长度归一化。

可见颗粒

[0110] 使用约2000勒克斯的白色荧光灯在黑色背景和白色背景上检查可见颗粒。将小瓶在检查下轻轻旋转,并且在每个背景下检查不少于5秒钟。

亚可见颗粒

使用微流成像(MFI,Micro-Flow Imaging™ 5200,普诺森公司(ProteinSimple))分析亚可见颗粒。每次分析之间进行水冲洗。此外,在样品分析之前进行水冲洗,以确保背景计数适合测试。报告了平均累积计数/mL。

实例1:pH对低浓度PD-1抗体配制品稳定性的影响

[0111] 为了测定抗体在pH范围内的稳定性,制备并纯化了替雷利珠单抗(表1)。首先,通过用10kDa MWCO透析盒将替雷利珠单抗透析到不同pH(5.0、5.5、6.0、6.5和7.0)的20mM磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中来制备低浓度抗体(10mg/ml)。将该抗体溶液通过Millex™ GP 0.22μm PES 33mm过滤器过滤,并且填充到2mL即用型玻璃小瓶(肖特公司(Schott))中。为了评估低浓度下对抗体稳定性的影响,将抗体样品置于40℃稳定室中两周(图1A-B中表示为“40C2W”),然后在10℃稳定室中暴露于光两周(图1A-B中表示为“pho2W”)。作为对照,将样品在其初始时间点(在图中表示为T0)进行测定。通过SEC-HPLC测量所有样品的纯度并通过CZE测量所有样品的电荷异质性。结果在图1A-B中以图形显示。

[0112] 观察到pH依赖性电荷谱的明显趋势,其中较低的pH配制品在热应力和光应力下均表现出较高的主峰%。在pH 5.0、热应力下和在pH 7.0、光应力下的配制品中观察到最高的抗体聚集体。综合而言,SEC-HPLC结果(图1A)和CZE结果(图1B)表明,与pH值为5.0和7.0时相比,pH为5.5-6.5的低浓度抗PD-1抗体配制品相对更稳定。因此,可以得出结论,pH 5.5-6.5的pH范围提供了抗体的稳定性。

实例2:pH对高浓度PD-1抗体配制品的粘度和稳定性的影响

[0113] 在低浓度抗体下测定pH范围的情况下,将该数据用于高浓度抗体的实验。为了制备替雷利珠单抗储备溶液,将替雷利珠单抗用10kDa MWCO透析盒缓冲液交换到表2中列出的不同缓冲液中。为了制备含海藻糖(150mM)的高浓度配制品,将高浓度海藻糖储备溶液掺入至替雷利珠单抗储备溶液中,然后通过使用30kDa Amicon Ultra™离心过滤器浓缩至约150mg/ml的替雷利珠单抗。

[0114] 测量蛋白质浓度和粘度。结果在表2中示出。结果显示,在pH 5.5和pH 6.0的组氨酸-组氨酸HCl缓冲液中配制的配制品表现出最低粘度。在同一组氨酸-组氨酸HCl缓冲液中浓度为150mg/ml的替雷利珠单抗,但在pH高于6.0时导致更高的粘度。如表2中所示,替雷利珠单抗配制品F4和F5在良好的粘度和低聚集度方面提供了良好的结果。值得注意的是,替雷利珠单抗抗体配制品F5的粘度(cP)为15.53,以及聚集度为2.99。

[0115] 为了确定高浓度(约150mg/mL)替雷利珠单抗配制品的冻融稳定性,将每种配制的替雷利珠单抗溶液通过Millex™ GP 0.22μm PES 33mm过滤器过滤并填充到2mL玻璃小瓶中。使样品经受在-40℃下冷冻并在室温下解冻的三个循环(冻融(3FT))。另外,将样品在40℃下储存2周(40C2W)。通过SEC-HPLC评估聚集形成。作为对照,将样品在其初始时间点进行分析,在表中表示为T0。结果总结在表2中。SEC-HPLC结果表明,在冻融实验中测试的配制品谱中形成了相似量的聚集体,初始时间点和冻融结束之间的大多数值是相同的。这表明这些替雷利珠单抗抗体配制品在高浓度下为抗体提供了适当的稳定性。关于在40℃下储存2周(40C2W)的替雷利珠单抗抗体配制品,检测到聚集体增加约0.6%至1.5%,再次表明这些

配制品在高浓度下为替雷利珠单抗抗体提供了适当的稳定性。观察到经40℃下储存2周的配制品4(F4)和冻融循环中的配制品5(F5)的聚集体量最低。

[0116] 考虑到聚集度和溶液粘度两者,包含组氨酸-组氨酸HCl缓冲液的高浓度抗PD-1抗体配制品(特别是pH 6.0)产生了最佳结果。

表2.不同缓冲液中高浓度PD-1抗体配制品的粘度和聚集体形成

编号	配制品	抗体浓度	粘度	通过 SEC-HPLC 的聚集体%		
		(mg/mL)	(cP)	T0	40C2W	冻融(3FT)
F1	pH6.5, 15 mM 组氨酸 +25 mM 柠檬酸盐, 150 mM 海藻糖	155.31	35.61	1.99	3.36	1.99
F2	pH6.0, 15 mM 组氨酸 +25 mM 柠檬酸盐, 150 mM 海藻糖	159.81	36.48	1.97	3.15	1.96
F3	pH6.5,20 mM 组氨酸-组氨酸 HCl, 150 mM 海藻糖	154.26	45.50	2.08	2.97	1.91
F4	pH6.0,20 mM 组氨酸-组氨酸 HCl, 150 mM 海藻糖	149.38	28.81	1.93	2.61	1.92
F5	pH5.5,20 mM 组氨酸-组氨酸 HCl, 150 mM 海藻糖	144.09	15.53	1.88	2.99	1.88
F6	pH6.0, 20 mM 组氨酸-HAc, 150 mM 海藻糖	158.58	39.81	1.96	3.00	1.93
F7	pH5.5, 20 mM 组氨酸-HAc, 150 mM 海藻糖	155.19	26.66	1.94	3.07	1.92
F8	pH6.0, 20 mM 组氨酸-柠檬酸, 150 mM 海藻糖	155.70	32.16	1.94	2.98	1.92
F9	pH5.5, 20 mM NaAc-HAc, 150 mM 海藻糖	155.19	29.15	2.15	3.49	2.13

注释:T0是指样品的初始时间点。40C2W是指在40℃下储存两周后的样品。冻融(3FT)是指样品经过三个冷冻和解冻循环。

实例3:评估含有NaCl的低浓度PD-1抗体配制品的构象和胶体稳定性

[0117] 这一实验确定了pH和NaCl对抗PD-1抗体的构象和胶体稳定性的影响。在本研究中,制备了pH 5.5、6.0和6.5的在20mM组氨酸-组氨酸HCl缓冲液中的不同浓度的NaCl和海

藻糖储备溶液。随后,将替雷利珠单抗通过透析缓冲液交换到20mM组氨酸-组氨酸HCl缓冲液(pH 5.5、6.0和6.5)中,以制备替雷利珠单抗储备溶液。将海藻糖储备溶液和/或NaCl储备溶液掺入替雷利珠单抗储备溶液中以获得所需的目标赋形剂浓度(表3)。将每个样品的最终抗体浓度调整至10mg/ml。

[0118] 通过测量中点去折叠温度(Tm)和起始聚集温度(Tagg)来评估替雷利珠单抗在含有NaCl的配制品中的构象和胶体稳定性(表3)。随着NaCl浓度的增加,Tm和Tagg值呈明显的下降趋势,而随着pH的升高,Tm和Tagg值呈轻微上升趋势。添加150mM NaCl显著降低了替雷利珠单抗配制品的构象和胶体稳定性。这些结果表明,在低抗体浓度下,pH 5.5-6.0和50-100mM NaCl的替雷利珠单抗配制品表现出最佳的构象和胶体稳定性。

表3.低浓度抗PD-1抗体配制品的中点去折叠温度和聚集温度

编号	配制品			热特性		
	pH	NaCl (mM)	海藻糖二水合物(mM)	Tm1 (℃)	Tm2 (℃)	Tagg (473 nm, ℃)
F10	5.5	50	160	57.32	80.10	77.87
F11	5.5	150	无	54.71	77	74.70
F12	6.0	100	80	59.76	79.54	77.16
F13	6.5	50	160	64.12	81.47	79.14
F14	6.5	150	无	61.28	79.09	76.73

实例4:高浓度PD-1抗体配制品的粘度

[0119] 这一实验确定了不同浓度海藻糖和NaCl对高浓度抗PD-1抗体配制品的粘度的影响。在本研究中,制备了pH 6.0的在20mM组氨酸-组氨酸HCl缓冲液中的不同浓度的NaCl和海藻糖储备溶液。随后,将替雷利珠单抗通过透析缓冲液交换到20mM组氨酸-组氨酸HCl缓冲液(pH 6.0)中,以制备高浓度替雷利珠单抗储备溶液。将海藻糖储备溶液和/或NaCl储备溶液掺入替雷利珠单抗高浓度抗体储备溶液中(表4和表5)。通过使用30kDa Amicon Ultra™离心过滤器将样品浓缩至不同的浓度。

[0120] 粘度分析在500S^{-1}的流速和约25℃的温度下进行。结果在表4中示出。该数据表明,抗PD-1抗体配制品的粘度随着抗体浓度的增加呈指数级增长。与碱缓冲液配制品相比,无论是浓度为100mM海藻糖,还是尤其较高浓度的240mM海藻糖时,添加100mM海藻糖和240mM海藻糖均提高了粘度。皮下配制品具有“注射器能力”的要素,即皮下配制品通过注射器(例如,20-25号)针头施用的能力。因此,需要添加降粘剂。

[0121] 值得注意的是,添加50mM NaCl降低了高浓度抗PD-1抗体配制品的粘度。相比之下,添加100mM NaCl产生相同的粘度降低,而140mM NaCl引起略微更突出的粘度降低影响。如实例3中所示,在pH 5.5-6.0和50-100mM NaCl下配制的替雷利珠单抗抗体显示出最佳的构象和胶体稳定性。考虑到粘度降低以及构象和胶体稳定性,考虑在高浓度抗PD-1抗体配制品中添加50-100mM NaCl。

表4.NaCl和海藻糖对含有20mM组氨酸的高浓度抗PD-1抗体配制品(pH 6.0)的溶液粘度的影响

稳定剂或降粘剂	抗体浓度（mg/mL）	粘度 在25℃（cP）下
无	160.42	16.53
	173.08	29.69
100 mM 海藻糖	143.48	13.15
	164.56	23.96
	180.50	31.79
240 mM 海藻糖	151.51	16.83
	163.54	21.72
	178.30	36.71
50 mM NaCl	155.91	13.58
	182.49	26.92
100 mM NaCl	151.20	12.43
	187.23	31.61
140 mM NaCl	158.97	14.25
	178.30	25.20

[0122] 还研究了含有50-100mM NaCl的抗PD-1抗体配制品在海藻糖的存在下的粘度和渗透压(表5中所示)。结果表明,50mM NaCl和100mM海藻糖组合在154.70mg/ml的替雷利珠单抗下的粘度值相似,粘度为13.98cP。70mM NaCl和80mM海藻糖的组合在152mg/ml的替雷利珠单抗下的粘度为13.43cP,而100mM NaCl和70mM海藻糖在153.64mg/ml的替雷利珠单抗下的粘度为11.52cP。

[0123] 当抗体浓度达到约180mg/ml时,粘度值均约为30cP。在粘度方面,所有测试的配制品都显示出改善的注射器能力。特别地,高浓度替雷利珠单抗配制品产生的粘度与含有通常用于皮下施用的23号或25号针头的注射器呈现良好的兼容性。另外,50mM NaCl和100mM海藻糖组合的粘度(在184.51mg/ml抗体浓度下为33.19cP)高于单独50mM NaCl的粘度(在182.49mg/mL下为26.92cP),这表明考虑添加不超过100mM的海藻糖是基于粘度和渗透压的考虑。

表5.NaCl和海藻糖组合对含有20mM组氨酸的高浓度抗PD-1抗体配制品(pH 6.0)的溶液粘度和渗透压的影响

稳定剂和降粘剂	抗体浓度（mg/mL）	粘度在25℃（cP）下	渗透压（mOsmol/kg）
50 mM NaCl + 100 mM 海藻糖	154.70	13.98	333
	174.10	23.36	NA
	184.51	33.19	
70 mM NaCl + 80 mM 海藻糖	152.00	13.43	301
	166.65	21.49	NA
	182.28	29.46	
100 mM NaCl + 70 mM 海藻糖	153.64	11.52	416
	161.20	15.15	NA
	181.69	26.45	

实例5:高浓度PD-1抗体配制品的稳定性

[0124] 在表6中列出的各种配制品中评估高浓度替雷利珠单抗抗体的稳定性。在20mM组氨酸-组氨酸HCl缓冲液中在pH 6.0下制备所有配制品。在100mM NaCl和70mM海藻糖组合中制备配制品F15和F16,而在50mM NaCl和100mM海藻糖组合中制备配制品F17。-在这些配制品中,聚山梨醇酯20的浓度范围为0至0.8mg/mL(相当于0.08%)。

[0125] 将替雷利珠单抗通过透析缓冲液交换到20mM组氨酸-组氨酸HCl缓冲液(pH 6.0)中,以产生替雷利珠单抗储备溶液。制备了pH 6.0的NaCl和海藻糖组合在20mM组氨酸-组氨酸HCl缓冲液中的储备溶液,并且掺入替雷利珠单抗储备溶液中。随后,使用30kDa Amicon Ultra™离心过滤器将样品浓缩至大约150mg/mL。通过添加高浓度PS20储备溶液制备具有不同浓度的聚山梨醇酯20(PS20:0、0.2mg/ml和0.8mg/ml)的配制品。使用0.22μm PES注射器过滤器过滤每种配制溶液,并填充到2mL即用型玻璃小瓶中,填充体积为0.5mL药物产品。

[0126] 通过使小瓶经受在-40℃下冷冻并在环境温度下解冻的三个循环(图中表示为“3FT”)来进行冻融研究。为了研究配制品的高温稳定性和搅拌稳定性,将样品在40℃稳定室中储存4周(图中表示为“40C4W”),或通过搅拌进行机械应力48小时(图中表示为“SK”)。通过A350、SEC(纯度)、CZE(电荷谱)和CE-SDS(NR)(纯度)评估配制品。作为对照,将样品在其初始时间点(在图中表示为T0)进行分析。这些结果在表8和图2-4中提供。

[0127] 通过测量350nm处的光密度测定药物产品的浊度。在40℃和25℃下储存的样品显示浊度轻微增加,而发现无PS20样品的A350高于其他样品。在振荡条件下,在无PS20样品中观察到A350更明显的增加,而在其他样品中没有观察到显著变化。任何配制品在冻融应力后浊度均无可测量的变化。

[0128] 在40℃下,在配制品F15、F16和F17中观察到抗体稳定性轻微下降,聚集体的量相应增加。另外,在振荡和冻融应力后,配制品的SEC纯度没有显著变化。所有配制品的SEC纯度均在单体的95.0%的临床验收标准内。在40℃下储存的样品显示主峰%和总碱性峰%降低(数据未显示),其中酸性峰%相应增加(数据未显示)。CE-SDS(NR)纯度表明,40℃储存4周仅导致单体轻微减少。在40℃下,不同配制品之间没有差异。

[0129] 总之,这些结果表明,含有PS20的高浓度替雷利珠单抗配制品(例如,F16和F17)在

搅拌、冻融和热应力、5℃和25℃储存6个月后是稳定的。随后,进行了另外的研究以确定配制品18(F18)的长期稳定性和加速稳定性,该配制品包含70mM NaCl和80mM海藻糖。在20mM组氨酸-组氨酸HCl缓冲液(pH 6.0)中通过浓缩和渗滤以约200mg/mL制备浓缩的替雷利珠单抗原料药。通过将NaCl、海藻糖和聚山梨醇酯20的储备溶液掺入替雷利珠单抗原料药中制备配制品F18,以获得表6中列出的目标组合物。使用0.22μm PES注射器过滤器过滤每种配制溶液,并填充到2mL即用型玻璃小瓶中,填充体积为2mL药物产品。将样品分阶段并且放置在5℃±3℃和25℃的稳定室中,其中每个时间点2个小瓶。研究的计划持续时间为在5℃±3℃下24个月以及在25℃下6个月。

[0130] 表9总结了配制品F18在152mg/ml下长达24个月的可见颗粒和亚可见颗粒结果。长达24个月的SEC(纯度)、CZE(电荷谱)和CE-SDS(NR)(纯度)结果在图5A-D中呈现。目视检查了152mg/ml的配制品F18,并发现在5℃±3℃下24个月和在25℃下6个月基本上没有可见颗粒。在5℃±3℃下没有观察到亚可见颗粒的显著变化,并且在25℃下检测到≥10μm颗粒的增加。另外,在5℃±3℃下均没观察到聚集体、SEC单体、CZE主峰和CE-SDS(NR)纯度显著变化。在25℃下储存6个月导致聚集体轻微增加,并且导致样品主峰CZE和CE-SDS(NR)纯度降低。然而,对于预期储存条件为5℃±3℃的液体配制品,在25℃下亚可见颗粒和聚集体的增加以及CZE和CE-SDS(NR)纯度主峰的降低是可以接受的。

[0131] 因此,综合考虑所有这些结果,配制品F16、F17和F18是适合临床使用的合适的皮下抗PD1抗体配制品。尤其,根据数月的稳定性数据,在152mg/ml下的配制品F18在推荐的5℃储存条件下稳定长达24个月,其产品质量属性没有可测量的变化。

表6.在稳定性研究中使用的配制品组合物

编号	抗体浓度（mg/mL）	配制品组合物
F15	157.97	20 mM 组氨酸-组氨酸 HCl，100 mM NaCl + 70 mM 海藻糖，pH6.0
F16	157.97	20 mM 组氨酸-组氨酸 HCl，100 mM NaCl + 70 mM 海藻糖，0.08%聚山梨醇酯 20，pH6.0
F17	151.02	20 mM 组氨酸-组氨酸 HCl，50 mM NaCl + 100 mM 海藻糖，0.02%聚山梨醇酯 20，pH6.0
F18	152	20 mM 组氨酸-组氨酸 HCl，70 mM NaCl + 80 mM 海藻糖，0.08%聚山梨醇酯 20，pH6.0

表7.配制品稳定性研究方案

	研究条件	测试项目
高温（40℃）研	将样品在 40℃稳定室中放置 4 周	浊度（$OD_{350\,nm}$）

究		纯度（SEC 和 CE-SDS（NR）） 电荷变体（CZE）
搅拌研究	通过振荡搅拌，800 rpm，48 小时	
冻融研究	在-40℃下冷冻并在环境温度下解冻的三个循环。	
加速稳定性（25℃）研究	将样品在25℃稳定室中放置6个月	可见颗粒 亚可见颗粒（MFI） 纯度（SEC 和 CE-SDS（NR）） 电荷变体（CZE）
长期稳定性（5℃±3℃）研究	将样品在5℃±3℃稳定室中放置24个月	

表8.配制品F15、F16和F17的浊度结果

		初始	40C4W	振荡	3FT	25C6M	5C6M
浊度（$OD_{350\ nm}$）	F15	0.106	0.141	0.485	0.107	0.135	0.104
	F16	0.104	0.130	0.104	0.103	0.126	0.118
	F17	0.093	0.125	0.104	0.104	0.116	0.105

注释:40C4W是指样品在40℃下储存4周。3FT是指样品经过3次冻融循环。25C6M是指样品在25℃下储存6个月。5C6M是指样品在5℃下储存6个月。

表9.配制品F18在5℃和25℃下的稳定性数据

	时间间隔		初始	3个月	6个月	12个月	18个月	24个月
152 mg/ml, 5C	可见颗粒		VPF	VPF	VPF	VPF	VPF	VPF
	亚可见颗粒（颗粒/ml）	≥10 μm	35	89	85	15	40	49
		≥25 μm	7	20	6	2	2	1
152 mg/ml, 25C	可见颗粒		VPF	VPF	VPF	NA	NA	NA
	亚可见颗粒（颗粒/ml）	≥10 μm	35	564	242	NA	NA	NA
		≥25 μm	7	31	25	NA	NA	NA

注释:VPF是指无可见颗粒。5C是指样品在5℃±3℃下储存。25C是指样品在25℃下储存。

实例6:皮下注射的生物利用度

[0132] 为了测试皮下配制品的生物利用度,使用配制品18(F18,表6)。将替雷利珠单抗静脉内(i.v.)施用于小鼠,并与10mpk(mg/kg)F18皮下施用到动物背部,10mpk皮下施用到动物腹部或20mpk皮下施用到动物腹部进行比较。对于本研究,使用了敲入人PD1的C57小鼠。皮下注射的总体生物利用度为75.8%。该数据在下表10中示出。

表10.替雷利珠单抗对C57-hPD1小鼠的皮下施用

	i.v	s.c-B	s.c-A	s.c-A	i.v	s.c-B	s.c-A	s.c-A
剂量（mg/kg）	10	10	10	20	10	10	10	20
浓度（mg/mL）	2	1	1	2	2	1	1	2
	$AUC_{0-最后}$（hr*μg/mL）				生物利用度（%）			
#1	10819	8691	5886	12666	/	91.2	61.8	66.4
#2	7764	6909	9026	15054	/	72.5	94.7	79.0
#3	10009	7231	7494	14426	/	75.9	78.6	75.7
#4		6800	7840	12451	/	71.4	82.3	65.3
平均值	9531	7408	7561	13649	/	78	79	72
中值，95% CI					/	75.8% [95% CI: 69.9%-82.5%]		

注释:s.c-B,背部皮下注射;s.c-A,腹部皮下注射

[0133] 在不同研究中,使用了NOD-SCID小鼠。将替雷利珠单抗静脉内(i.v.)施用于小鼠,并与10mpk(mg/kg)F18皮下施用到动物背部,20mpk皮下施用到动物背部,10mpk皮下施用到动物腹部或20mpk皮下施用到动物腹部进行比较。皮下注射的总体生物利用度为54.8%。该数据在下表11中示出。

表11.替雷利珠单抗对NOD-SCID小鼠的皮下施用

	i.v	s.c-B	s.c-B	s.c-A	s.c-A	i.v	s.c-B	s.c-B	s.c-A	s.c-A
剂量（mg/kg）	10	10	20	10	20	10	10	20	10	20
浓度（mg/mL）	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2
	$AUC_{0-最后}$（hr*μg/mL）					生物利用度（%）				
#1	12187	6662	13593	8798	10385	/	57.5	58.7	76.0	44.9
#2	11105	8117	12390	6354	11318	/	70.1	53.5	54.9	48.9
#3	11499	8820	12640	8605	11257	/	76.2	54.6	74.3	48.6
#4	11515	7085	12321	6329	12127	/	61.2	53.2	54.7	52.4
平均值	11577	7671	12736	7521	11272	/	66	55	65	49
中值，95% CI						/	54.8% [95% CI：53.4%-64.1%]			

注释:s.c-B,背部皮下注射;s.c-A,腹部皮下注射

[0134] F18配制品也在一种较大的动物Sprague Dawley大鼠中进行了测试。将替雷利珠单抗以100mpk(10mg/ml)静脉内施用,以100mpk(150mg/ml)皮下施用到大鼠腹部,以100mpk(100mg/ml)皮下施用到腹部,以200mpk(150mg/ml)皮下施用到腹部,或以100mpk(150mg/ml)皮下施用到背部。总体生物利用度为57.2%,且该数据如图6A-B所示。

[0135] 还在小型猪模型中测试了F18替雷利珠单抗配制品。对于本研究,将6mpk静脉内施用于小型猪,同时将6mpk皮下注射到腿部或将6mpk皮下注射到动物耳后。替雷利珠单抗通过皮下注射的总体生物利用度为79.8%。该数据在下表12中示出。

表12.替雷利珠单抗对小型猪的皮下施用

	IV	SC-腿	SC-耳后	IV	SC-腿	SC-耳后
注射部位	静脉内推注	腿	耳后	静脉内推注	腿	耳后
剂量（mg/kg）	6	6	6	6	6	6
浓度(mg/mL)	10.3	147.3	147.3	10.3	147.3	147.3
体积（mL/kg）	0.583	0.041	0.041	0.583	0.041	0.041
	AUC_{0-336}（hr*μg/mL）			生物利用度（%）		
#1	15220.45	7613.11	10915.52	/	58.03	83.20
#2	7584.392	10022.78	5544.97	/	76.40	42.27
#3	16552.22	13093.80	7899.81	/	99.81	60.22
#4	/	14910.93	8426.25	/	113.66	64.23
#5	/	14466.60	14982.78	/	110.27	114.21
平均值	13119.02	12021.44	9553.87	/	91.63	72.83
中值，95% CI				/	79.8% [95% CI: 63.6%-100.9%]	

[0136] 最后,在猴PK研究中测试了替雷利珠单抗皮下配制品。对三只猴给予30mg/kg的F18替雷利珠单抗配制品,其中在给药后0、4小时、8小时、24小时、48小时、4天、7天、14天和21天的时间点采集血液。结果显示在图7中,其中皮下结果与先前使用IV配制品和施用进行的猴研究的AUC进行了比较。体重没有明显变化,并且也没有发现临床病理。注射部位没有发现组织病理学变化。

[0137] 替雷利珠单抗皮下配制品耐受性良好,不管注射部位或所用浓度,在大鼠或小型猪模型中均无注射部位反应,如图8中所示。

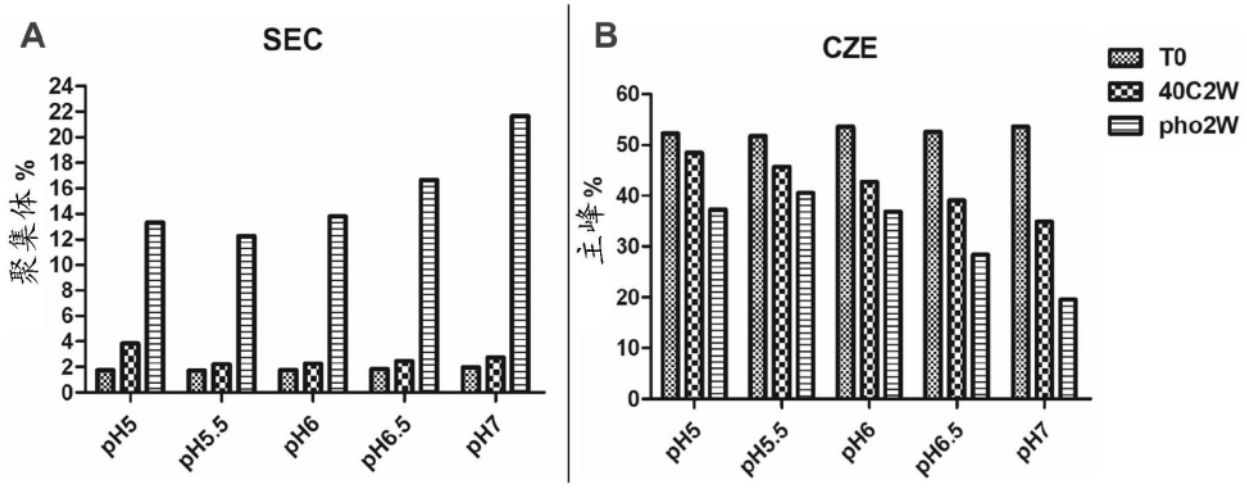
A
SEC
聚集体 %
pH5
pH5.5
pH6
pH6.5
pH7
B
CZE
主峰 %
T0
40C2W
pho2W

图1A-B

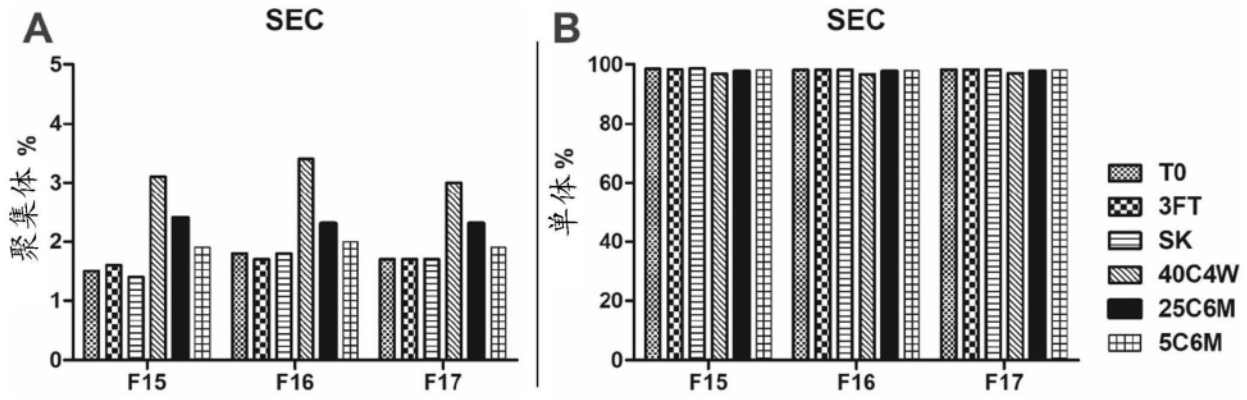
A
SEC
聚集体 %
F15
F16
F17
B
SEC
单体 %
T0
3FT
SK
40C4W
25C6M
5C6M

图2A-B

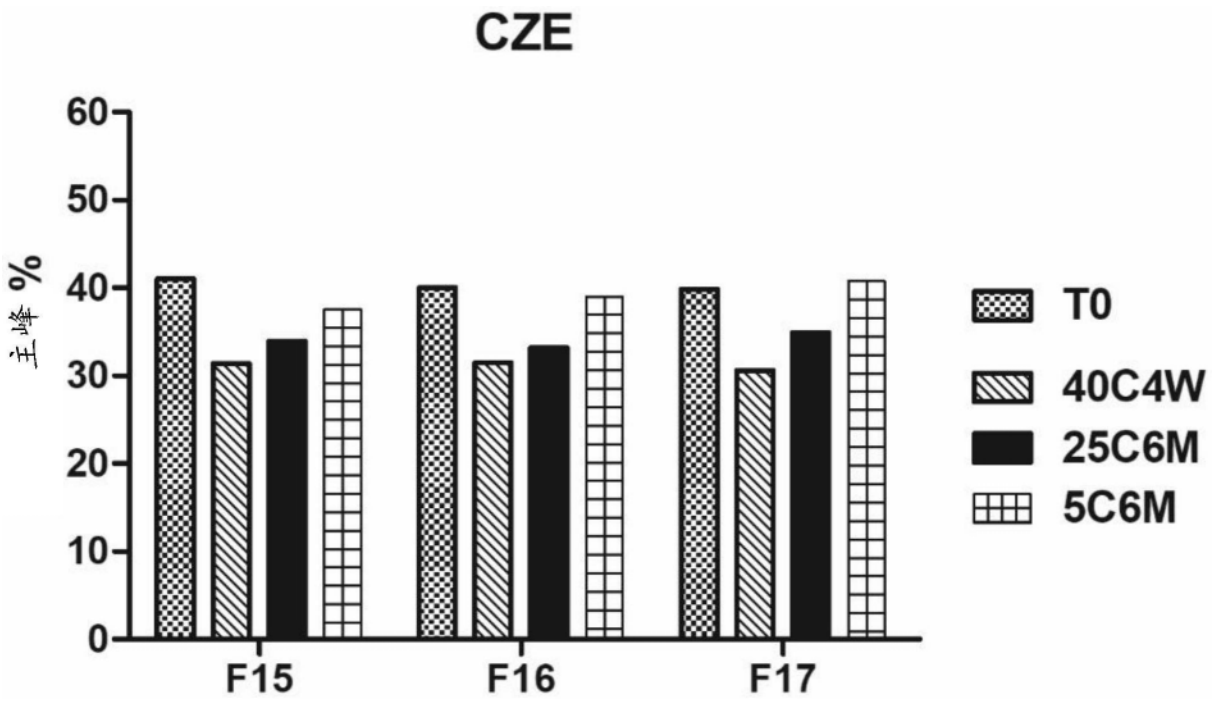
CZE
主峰 %
60
50
40
30
20
10
0
F15
F16
F17
T0
40C4W
25C6M
5C6M

图3

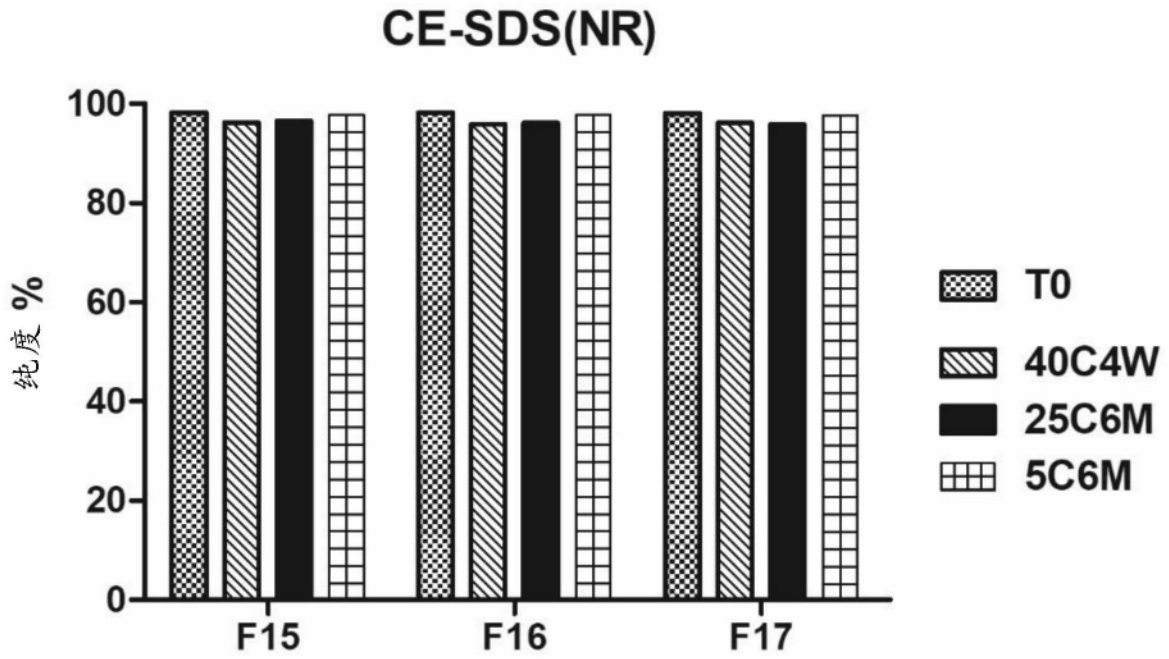
CE-SDS(NR)
纯度 %
100
80
60
40
20
0
F15
F16
F17
T0
40C4W
25C6M
5C6M

图4

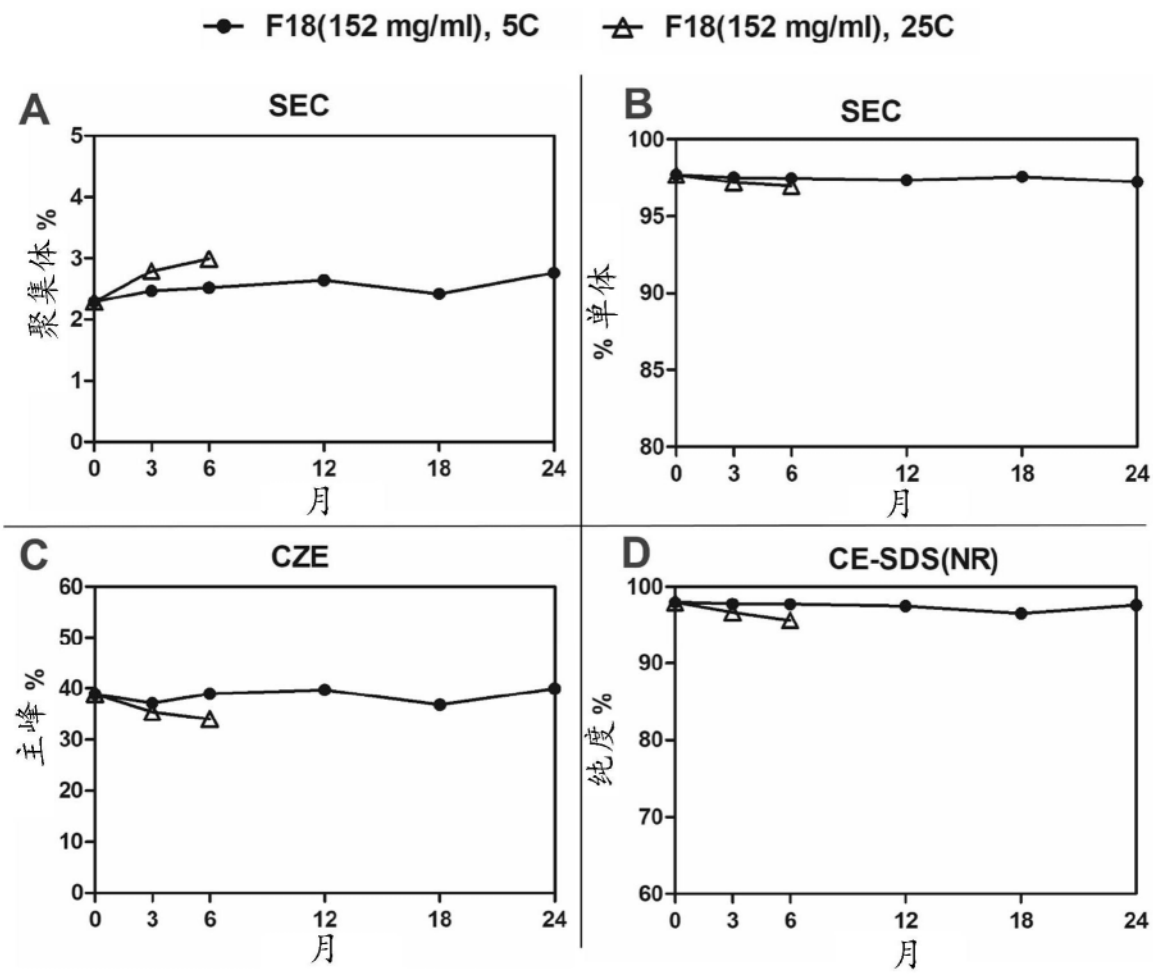
F18(152 mg/ml), 5C
F18(152 mg/ml), 25C
A
SEC
聚集体 %
月
B
SEC
% 单体
月
C
CZE
主峰 %
月
D
CE-SDS(NR)
纯度 %
月

图5A-D

	IV	SC-1	SC-2	SC-3	SC-4	IV	SC-1	SC-2	SC-3	SC-4
注射部位	尾静脉	腹部			背部	尾静脉	腹部			背部
剂量 (mg/kg)	100	100	100	200	100	100	100	100	200	100
浓度 (mg/ml)	10	150	100	150	150	10	150	100	150	150
体积 (mL/kg)	10	0.67	1	1.33	0.67	10	0.67	1	1.33	0.67

图6A

	$AUC_{0\text{-}240}$ (hr*μg/mL)					生物利用度 (%)				
#1	290738	162455	165827	312280	147467	/	58.3	59.5	56.0	52.9
#2	262523	180005	130094	350869	152917	/	64.6	46.7	62.9	54.8
#3	260808	156334	138913	341289	126669	/	56.1	49.8	61.2	45.4
#4	301364	163346	155369	363486	172903	/	58.6	55.7	65.2	62.0
平均值	278859	165535	147551	341981	149989	/	59.4	52.9	61.3	53.8
中值，95% CI						/	57.2% [95% CI: 53.7-60.0%]			

图6B

剂量水平 (mg/kg)	动物 ID	$T_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-504h}/ 剂量	生物利用度 %
30 (SC)	1-1	348	24	518	5,113	114
	1-2	44.3	24	357	1,571	35
	1-3	79.4	48	309	2,085	47
平均		157	32	395	2,923	65
3-30 (IV)	N/A	N/A	N/A	N/A	4,470	

图7

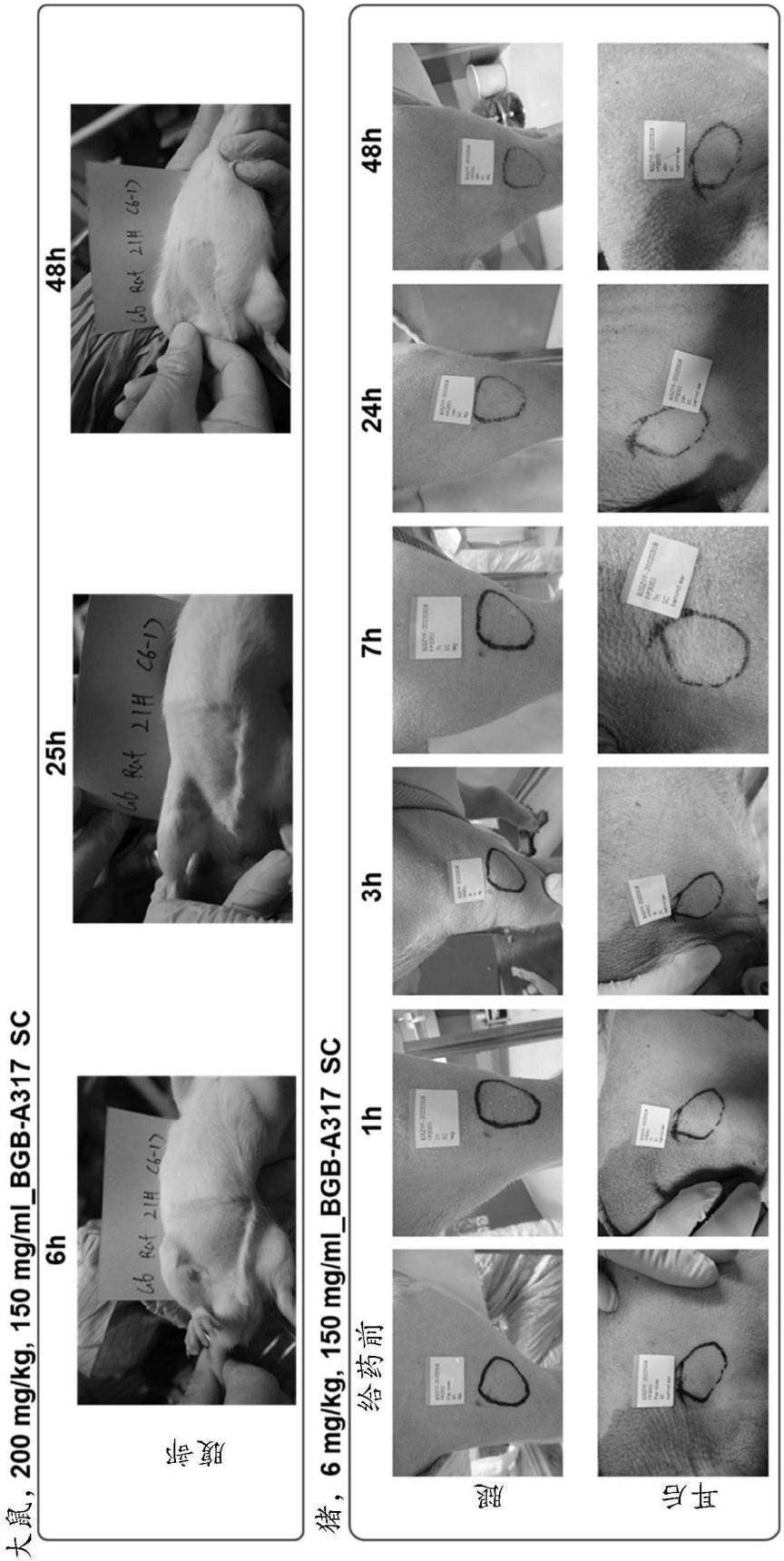
大鼠，200 mg/kg, 150 mg/ml_BGB-A317 SC
6h
25h
48h
腹部
猪，6 mg/kg, 150 mg/ml_BGB-A317 SC
给药前
1h
3h
7h
24h
48h
腿
耳后

图8