[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/00 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780022178.4

[43] 公开日 2009 年 6 月 24 日

[11] 公开号 CN 101466404A

[22] 申请日 2007.6.13
[21] 申请号 200780022178.4
[30] 优先权
[32] 2006.6.14 [33] US [31] 60/813,958
[86] 国际申请 PCT/US2007/071119 2007.6.13
[87] 国际公布 WO2007/147001 英 2007.12.21
[85] 进入国家阶段日期 2008.12.15
[71] 申请人 埃姆克隆系统股份有限公司
地址 美国纽约
[72] 发明人 米尔·阿加尔赫达
阿尔温德·斯里瓦斯塔瓦
乔尔·戈尔茨坦

[74] 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有限公司
代理人 黄泽雄 崔 华

权利要求书 3 页 说明书 14 页 序列表 15 页
附图 10 页

[54] 发明名称

抗 - EGFR 抗体的冻干制剂

[57] 摘要

在一个实施方案中，本发明提供了一种稳定的冻干制剂，所述制剂包含抗 - EGFR 抗体、优选西妥昔单抗；乳糖酸；和缓冲剂，优选组氨酸。 在一个优选实施方案中，本发明提供了稳定的冻干制剂，所述制剂包含约 50mg/mL 到约 140mg/mL 的 ERBITUX®、约 0.125％乳糖酸、pH 值约 6.0 的约 25mM 组氨酸缓冲剂、约 0.005％吐温 - 80® 和约 1.875％甘氨酸。

1.一种冻干制剂，所述制剂包含抗-EGFR抗体、乳糖酸和缓冲剂。

2.根据权利要求1所述的冻干制剂，其特征在于，所述抗-EGFR抗体是西妥昔单抗。

3.根据权利要求1所述的冻干制剂，其特征在于，所述缓冲剂是组氨酸。

4.一种适合于冻干的水性制剂，所述制剂包含抗-EGFR抗体、乳糖酸和缓冲剂。

5.根据权利要求4所述的水性制剂，其特征在于，所述抗-EGFR抗体以约10 mg/mL到约140 mg/mL的浓度存在。

6.根据权利要求5所述的水性制剂，其特征在于，所述抗-EGFR抗体以约50 mg/mL到约140 mg/mL的浓度存在。

7.根据权利要求5所述的水性制剂，其特征在于，所述抗-EGFR抗体以约50 mg/mL的浓度存在。

8.根据权利要求4所述的水性制剂，其特征在于，所述乳糖酸以约0.1%到约0.5%的浓度存在。

9.根据权利要求8所述的水性制剂，其特征在于，所述乳糖酸以约0.125%到约0.25%的浓度存在。

10.根据权利要求8所述的水性制剂，其特征在于，所述乳糖酸以约0.125%的浓度存在。

11.根据权利要求4所述的水性制剂，其特征在于，所述缓冲剂选自由组氨酸、苹果酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、醋酸盐和其组合组成的组。

12.根据权利要求4所述的水性制剂，其特征在于，所述缓冲剂具有约5.5到约6.5的pH值。

13.根据权利要求12所述的水性制剂，其特征在于，所述缓冲剂具有约6.0的pH值。

14.根据权利要求4所述的水性制剂，其特征在于，所述缓冲剂以约

5 mM到约 50 mM的浓度存在。

15.根据权利要求 14 所述的水性制剂，其特征在于，所述缓冲剂以约 10 mM到约 25mM的浓度存在。

16.根据权利要求 14 所述的水性制剂，其特征在于，所述缓冲剂以约 25 mM的浓度存在。

17.根据权利要求 4 所述的水性制剂，所述制剂进一步包含选自由多羟基糖类、糖醇、糖类衍生物、氨基酸、易溶盐和其组合组成的组的稳定剂。

18.根据权利要求 17 所述的水性制剂，其特征在于，所述稳定剂选自由甘露醇、甘氨酸和其组合组成的组。

19.根据权利要求 4 所述的水性制剂，所述制剂进一步包含表面活性剂。

20.根据权利要求 19 所述的水性制剂，其中所述表面活性剂选自由聚氧乙烯（20）单月桂酸山梨醇酐酯、聚氧乙烯（20）单油酸山梨醇酐酯、聚氧乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物、胆汁盐和其组合组成的组。

21.根据权利要求 19 所述的水性制剂，其特征在于，所述表面活性剂是聚氧乙烯（20）单油酸山梨醇酐酯。

22.根据权利要求 19 所述的水性制剂，其特征在于，所述表面活性剂以约 0.001%到约 0.01%的浓度存在。

23.根据权利要求 22 所述的水性制剂，其特征在于，所述表面活性剂以约 0.005%到约 0.01%的浓度存在。

24.根据权利要求 22 所述的水性制剂，其特征在于，所述表面活性剂以约 0.005%的浓度存在。

25.根据权利要求 4 所述的水性制剂，其特征在于，所述抗-EGFR 抗体以约 50 mg/mL 的浓度存在，所述乳糖酸以约 0.125%的浓度存在，组氨酸以约 25 mM 的浓度存在。

26.根据权利要求 25 所述的水性制剂，所述制剂进一步包含浓度约 0.005%的聚氧乙烯（20）单油酸山梨醇酐酯。

27.一种由权利要求 4 所述的水性制剂制成的冻干制剂。

28. 一种稳定抗体的方法，所述方法包括冻干包含抗-EGFR 抗体、乳糖酸和缓冲剂的水性制剂。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述缓冲剂是组氨酸。

30. 一种治疗哺乳动物的方法，包括向需要的哺乳动物施用治疗有效量的权利要求 1 所述的重新配制的冻干制剂。

抗-EGFR 抗体的冻干制剂

本申请要求了 2006 年 6 月 14 日提交的美国临时专利申请系列号 NO. 60/813,958 的优先权权益，所述内容通过引用合并在此。

技术领域

本发明涉及用于结合表皮生长因子受体（EGFR）抗体的抗体的稳定性的制剂和方法。更特别地，本发明涉及抗-EGFR 抗体、特别是西妥昔单抗（cetuximab），与组氨酸缓冲剂中的乳糖酸的制剂。

背景技术

为了实现抗体的临床潜力，必需在保存和施用期间维持所述抗体的生物学活性。化学和物理的不稳定性能够促进生物学活性的降低。由于水和温度的变化，抗体可能发生凝聚、氧化、脱酰胺或水解。保持抗体的生物学活性的一种方法是通过冻干来稳定抗体制剂。一旦重新配制，特别有用的冻干制剂可提供高的抗体浓度。需要抗 EGFR 抗体的稳定的冻干制剂。

发明内容

因此，本发明提供了适合于冻干的稳定的水性制剂，所述制剂包含约 50mg/mL 到约 140 mg/mL 的蛋白质浓度范围内的抗-EGFR 抗体、乳糖酸和缓冲剂。抗-EGFR 抗体优选是西妥昔单抗。乳糖酸以约 0.1%到约 0.5%的浓度，或更优选的以约 0.125%到约 0.25%的浓度存在。

制剂优选地被缓冲到约 6.0 的 pH 值，所述缓冲剂优选地以约 25 mM 的浓度存在，所述缓冲剂优选地是组氨酸缓冲剂。

稳定的水性制剂进一步包括选自由甘露醇、甘氨酸以及其组合构成的组的稳定剂，以及表面活性剂。表面活性剂优选是聚氧乙烯（20）单

油酸山梨醇酐酯、聚氧乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物，和/或其组合。

本发明还提供了通过冷冻和干燥上文描述的本发明稳定的水性制剂而制备的冻干抗-EGFR 制剂。

本发明进一步提供了稳定抗-EGFR 抗体的方法，所述方法包括用上文描述的本发明稳定的水性制剂配制所述抗体。

此外，本发明提供了治疗哺乳动物，例如人类的方法，所述方法包括向需要的哺乳动物施用治疗有效量的如上文所描述的重新配制的冻干制剂。

总之，本发明提供了包含抗-EGFR 抗体，优选西妥昔单抗；乳糖酸；和缓冲剂，优选组氨酸的稳定的冻干制剂。在优选的实施方案中，蛋白质浓度是约 50 mg/mL 到约 140 mg/mL。除了乳糖酸之外，所述制剂可以含有一种或多种如甘露醇和甘氨酸的稳定剂。所述制剂还可以含有表面活性剂，例如吐温-80®（聚氧乙烯（20）单油酸山梨醇酐酯）或普朗尼克 F-68（PluronicF-68®）（聚氧乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物）。在一个优选的实施方案中，本发明提供了稳定的冻干制剂，所述制剂包含约 50 mg/mL 到约 140 mg/mL 的 ERBITUX®、约 0.125%乳糖酸、pH 值约 6.0 的约 25 mM 组氨酸缓冲液、约 0.005% 吐温-80 以及约 1.875%甘氨酸。

本发明还提供了稳定抗体的方法，所述方法包括冻干包含抗-EGFR 抗体、优选西妥昔单抗；乳糖酸；和缓冲剂、优选的组氨酸。

本发明还提供了治疗方法，所述治疗方法包括向需要的哺乳动物，例如人类施用重新配制的制剂。在用西妥昔单抗治疗的情况下，所施用的量与本领域技术人员所熟知的量相同。

本发明提供了包含抗-EGFR 抗体、乳糖酸和缓冲剂的稳定的冻干制剂。所述制剂可以包含其他的成分，例如稳定剂、表面活性剂、还原剂、载体、防腐剂、氨基酸和螯合剂。本发明还提供了稳定的方法，所述方法包括冻干抗-EGFR 抗体的水性制剂。在加工和保存期间，所述制剂可以被冻干以稳定抗-EGFR 抗体，然后所述制剂能够被重新配制以用于药物施用。优选地，从产生到施用，所述抗体基本上保持了其物理和化学稳定性以及完整性。适合于提高本发明稳定的各种制剂成分包括缓冲剂、pH

值、表面活性剂、糖类、糖醇、糖类衍生物和氨基酸。

本发明的制剂被冻干。所述冻干是一种稳定化过程，在所述过程中物质先被冷冻，然后先通过升华（最初的干燥过程），然后脱附（次级的干燥过程），将溶剂的数量降低到不能再支持生物学活性或化学反应的值。在冻干制剂中，能够显著地避免或减缓了与溶液相关的水解、脱酰胺和氧化反应。冻干制剂还可以避免装运期间的短期超温引起的损害。本发明的制剂还可以通过本领域已知的其他方法，如喷雾干燥和气泡干燥进行干燥。除非另作说明，本发明的制剂采用冻干前测量的制剂中的其成分浓度进行描述。

本发明制剂含有乳糖酸作为稳定剂。乳糖酸浓度优选是约 0.1%到约 0.5%，更优选是约 0.125%到约 0.25%，以及最优选是约 0.125%（重量/体积）。

在优选实施方案中，一旦重新配制，所述冻干制剂提供高浓度的抗-EGFR 抗体。优选地，冻干之前水性制剂中的抗体浓度是约 10 mg/mL 到约 140 mg/mL，更优选地约 50 到约 140 mg/mL，以及最优选地是约 50 mg/mL。在优选实施方案中，所述稳定的冻干制剂是可用液体进行重新配制以形成具有比冻干前制剂的抗体浓度高约 1-10 倍的抗体浓度的溶液。例如，在一个实施方案中，冻干的制剂用 1 mL 或更少的百万级质量的(milli-Q)水进行重新配制，以获得具有约 50 mg/mL 到约 200 mg/mL 的抗体浓度的无颗粒的重新配制的制剂。

可以采用本领域已知的各种分析技术对重新配制的冻干制剂的抗体的稳定性进行测量。这样的技术包括，例如，（i）利用差示扫描量热法（DSC）测定主要熔融温度以测定其热稳定性（Tm）；（ii）在室温下利用控制的搅拌以测定其机械稳定性；（iii）测定其在约-20℃、约 4℃、室温（约 23℃-27℃）、约 40℃和约 50℃温度下的实时等温的加速升温稳定性；（iv）通过监测 350nm 处的吸光度以测定其溶液浊度，和（v）通过利用 SEC-HPLC（尺寸排阻色谱-高效液相色谱）测定单体、凝聚物和降解物的数量。可以在选定的温度下大约选定时间期间测量稳定性。在优选的实施方案中，所述制剂在 60℃约 96 小时，和室温下至少 1 个月是稳定

的。

本发明的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体，或任何其他适宜类型的抗体，例如抗体的片段或衍生物、单链抗体（scFv）或合成的抗体同源物，只要所述抗体具有与完整抗体相同的结合特征，或具有与完整抗体可比较的结合特征。如在此使用的，除非另有说明或上下文是清楚的，抗体结构域、区域以及片段是根据本领域公知的标准定义。参见，例如，Abbas 等，《细胞与分子免疫学》，W.B.桑德斯公司，费城，PA(1991)。

裂解整个抗体可以产生抗体片段。抗体片段也可以通过表达编码片段的 DNA 来产生。抗体的片段可以通过 Lamoyi 等人，《*J. Immunol. Methods*》，56: 235-243（1983）和通过 Parham，《*J. Immunol.*》131: 2895-2902（1983）描述的方法来制备。这样的片段可以含有一个或两个 Fab 片段或 $F(ab')_2$ 片段。这样的片段还可以含有单链片段可变的区域抗体，即，scFv，双抗体，或其他抗体片段。优选地，抗体片段含有完整抗体的所有六个互补决定区域，而含有少于所有这些区域的，例如三个、四个或五个 CDR 的片段也可能是有功能的。抗体片段还可以轭合到载体分子。某些适合的载体分子包括钥孔血蓝素和牛血清白蛋白。轭合可以通过本领域已知的方法来进行。

本发明的抗体还包括通过直接突变、亲和力成熟的方法、噬菌体展示或链混洗改善了结合特征的那些抗体。通过突变 CDR 和筛选具有期望特性的抗原结合位点，可以修饰或改善亲和力和特异性（参见，例如 Yang 等人，《*J. Mol. Bio.*》，254: 392-403（1995））。以各种方式突变 CDR。一种方式是使单独的残基或残基组合随机化，使得在其它相同抗原结合位点的群体中，于特定的位置上发现所有二十种氨基酸。可选择地，通过差错 PCR 方法在 CDR 残基的范围上诱导突变（参见，例如 Hawkins 等人，《*J. Mol. Bio.*》，226: 889-896（1992））。含有重链和轻链可变区基因的噬菌体展示载体在 E.coli 的突变菌株中增殖（参见，例如 Low 等人，《*J. Mol. Bio.*》，250: 359-368（1996））。这些诱变方法是本领域技术人员已知的许多方法中的举例说明。

本发明的抗体还可以是双特异性和/或是多价的。已经开发了多种化

学和重组方法用于产生双特异性和/或多价的抗体片段。综述参见 Holliger 和 Winter，《*Curr. Opin. Biotechnol*》. 4: 446-449 (1993); Carter 等人，《*J. Hematotherapy*》 4: 463-470 (1995); Plückthun 和 Pack，《*Immunotechnology*》 3，83-105 (1997)。双特异性和/或二价已经通过经由柔性接头、亮氨酸拉链结基序、C_HC_L-异二聚化来融合两个 scFv 分子，和通过 scFv 分子的缔合以形成二价的单特异性双抗体和相关的结构而实现。通过利用例如 p53、链霉抗生物素蛋白和螺旋-转角-螺旋基序，在 scFv 或 Fab 片段的羧基或氨基末端处添加多聚化序列已经实现了多价化。例如，通过经由 (scFv1) -铰链-螺旋-转角-螺旋-(scFv2) 形式的 scFv 融合蛋白的螺旋-转角-螺旋基序的二聚作用，产生了具有针对两个目标抗原的每一个的两个 scFc 结合位点的四价双特异性微型抗体。改善的亲和力也可以通过提供三个功能性抗原结合位点来获得。例如，具有连接 V_H和 V_L结构域的缩短的接头的 scFv 分子缔合来形成三抗体 (Kortt 等人，《*Protein*》 *Eng.* 10: 423-433 (1997))。

IgG 型双特异性抗体的产生已经通过两个不同的 IgG 分子的化学交联，或通过同一细胞的两个抗体的共表达来实现，所述 IgG 型双特异性抗体类似于 IgG 抗体在于它们具有更多或更少的完整 IgG 恒定区结构。开发来克服转染的细胞中共表达的 IgG 重链和轻链的两个不同组之间不需要的配对的一种策略是，修饰两个重链的 C_H3 结构域来降低同样的抗体重链之间的同二聚化。Merchant 等人，《*Nat. Biotechnology*》 16: 677-681 (1998)．在该方法中，通过需要对双特异性抗体的每个结合位点使用相同的轻链以消除轻链错配。

在某些情况下，维持除了抗原特异性以外的功能或结构方面是所希望的。例如，补体介导的细胞毒性 (CMC) 和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 在大多数双特异性抗体中丧失了，所述补体介导的细胞毒性 (CMC) 和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 需要 Fc 区域重链恒定区的存在和功能。Coloma 和 Morrison 通过将 scFv 融合到完整重链的 C-末端创造了具有 Fc 结构域的二价 BsAb 分子的匀质群体。具有抗体轻链的融合物的共表达导致二价的、双特异性分子的均质群体的产生，

所述分子在一个末端结合一种抗原，在另一个末端结合第二种抗原（Coloma 和 Morrison，《*Nat. Biotechnology*》15，159-163（1997））。然而，这种分子具有活化补体的能力降低，并且没有能力影响 CMC。而且，C_H3 结构域结合到高亲和力 Fc 受体（Fc γ R1）的亲和力降低。Zhu 等人，PCT/US01/16924，描述了用单链 Fvs 替换 Ig 可变区来产生四聚的 Ig 样蛋白质，所述蛋白（1）是双特异性和二价的，（2）是基本上匀质的，而没有关于抗原结合位点的选择的约束，（3）包含 Fc 恒定结构域并保持了缔合功能，和（4）可以在哺乳动物或其他细胞中产生而不用进一步的加工。通过类似的方法，可以产生双特异性单价 Fab 样蛋白质或多肽。

优选的，本发明的抗体是单克隆抗体。本发明的抗体可以是具有一种物种，例如小鼠的抗体的可变区的、以及不同物种的，例如人类的抗体的恒定区的嵌合抗体。可选择地，本发明的抗体可以是人源化抗体，具有来自一种物种，例如小鼠的抗体的高变区或互补决定区（CDR），以及人类抗体的框架可变区和恒定区。还可选择，本发明的抗体可以是具有人类抗体的恒定区和可变区的人类抗体。

如在此使用的，“抗体”和“抗体片段”包括保持对 EGF 受体的特异性的修饰。这些修饰包括但不限于，结合到效应分子例如化学治疗剂（例如，顺铂、紫杉酚、多柔比星）或细胞毒素（例如，蛋白质或非蛋白质的有机化学治疗剂）。抗体可以通过结合到可检测报告物部分来修饰。还包括变化的抗体，所述变化影响到非结合特性，例如半衰期（例如，PEG 化）。

本发明的抗体或其片段的等同物还包括具有与全长抗-EGFR 抗体的可变区或高变区的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽。基本上相同的氨基酸序列在此被定义为通过根据 Pearson 和 Lipman（《Proc. Natl. Acad. Sci.》USA 85，2444-8（1988））的 FASTA 搜索方法测定的、与另一个氨基酸序列具有至少 70%、优选的至少约 80%、更优选的至少约 90%同源性的序列。

在优选的实施方案中，抗-EGFR 抗体结合 EGFR 并阻断配体，例如 EGF 或 TNF-α 与 EGFR 的结合。这种阻断通过干扰 EGFR 活化的效果引起肿瘤

生长的抑制，所述肿瘤生长包括肿瘤侵入、转移、细胞修复和血管生成。因而，优选的抗 EGFR 抗体是西妥昔单抗（cetuximab）。西妥昔单抗（Cetuximab）是嵌合抗体（商标为 ERBITUX®，也称为 C225），其具有约 152 kDa 的分子量和约 8.0 的等电点。西妥昔单抗结合 EGFR 并阻断配体的结合。此外，或作为选择，西妥昔单抗可以促进受体-抗体复合物的内在化，阻止受体被它的配体或任何其他机制的进一步刺激。西妥昔单抗的进一步特征在美国申请 No.08/973,065（Goldstein 等人）和 09/635,974(Teufel);WO 99/60023(Waksal 等人)和 WO 00/69459(Waksal)中公开，通过引用将所有这些合并在此。

西妥昔单抗的嵌合重链和轻链的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO: 2 和 4 提供。SEQ ID NO: 1 和 3 提供了各自的编码嵌合抗体链的核苷酸序列。在本发明的实施方案中，与可裂解的信号序列一起表达抗体重链和轻链，所述可裂解的信号序列指导宿主细胞中的转运和分泌。SEQ ID NO: 6 和 8 分别提供了西妥昔单抗重链和轻链的氨基末端信号肽的氨基酸序列。SEQ ID NO: 5 和 7 提供了编码核苷酸序列。

在另一个实施方案中，抗-EGFR 抗体是特异于 EGFR 的、完全人类的单克隆抗体，例如，帕尼单抗（panitumumab）（先前的 ABX-EGF; Abgenix 公司）。ABX-EFG 以高特异性结合 EGFR，阻断 EGFR 与它的两种配体 EGF 和 TNF-α的结合。ABX-EGF 的序列和特征在美国专利 No. 6,235,883 中第 28 栏第 62 行到第 29 栏第 36 行以及在附图 29-34 中公开，通过引用将其合并在此。还参见 Yang 等人，《*Critical Rev. Oncol./Hematol.*》，38（1）：7-23，2001，这也通过引用合并在此。

在另一个实施方案中，抗 EGFR 抗体是特异于 EGFR 的人源化单克隆抗体，例如，马妥珠单抗（matuzumab）（先前的 EMD 72000; Merck KGaA）。马妥珠单抗（Matuzumab）以高特异性结合 EGFR，并抑制配体结合。马妥珠单抗的序列和特征在美国专利 5,558,864 中第 19 栏第 43 行到第 20 栏第 67 行中公开，通过引用将其合并在此。也参见，Kettleborough 等人，《*Prot.*》*Eng.*，4(7):773-83,1991。尼妥珠单抗(Nimotuzumab)(TheraCIM h-R3; YM 生物科技公司）是人源化抗体的另一个实例。尼妥珠单抗

（nimotuzumab）的序列和特征在美国专利5,891,996中第10栏第54行到第13栏第6行中公开。还参见Mateo等人，《*Immunotechnology*》，3:71-81，1997。

根据本发明，缓冲剂可以用于维持制剂的pH值。缓冲剂最小化由于外部变化的pH值变动。本发明的制剂含有一种或多种缓冲剂来提供处于合适的pH值的制剂，优选的约5.5到约6.5，最优选的约6.0。示范性的缓冲剂包括但不限于有机缓冲剂，一般地，例如，组氨酸、苹果酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐和醋酸盐。优选的，缓冲剂是组氨酸。缓冲剂浓度优选的是约5 mM到约50 mM，更优选的约10 mM到约25 mM，最优选的约25 mM。特别优选的缓冲剂是pH值约6.0的约25 mM组氨酸。

本发明的制剂可以含有一种或多种表面活性剂。抗体溶液在气-水界面处具有高的表面张力。为了降低这种表面张力，抗体倾向于在气-水界面处凝聚。表面活性剂最小化气-水界面处的抗体凝聚，从而帮助维持抗体在溶液中的生物学活性。例如，添加0.01%吐温-80®可以降低溶液中的抗体凝聚。当制剂被冻干时，表面活性剂可以降低重新配制的制剂中颗粒的形成。在本发明的冻干制剂中，表面活性剂可以添加到一种或多种预冻干制剂、冻干的制剂和重新配制的制剂中，但优选是预冻干制剂。例如，0.005%吐温-80®可以在冻干前添加到抗体溶液中。表面活性剂包括但不限于吐温-20®（聚氧乙烯-20-单月桂酸山梨醇酐酯）、吐温-80®、普朗尼克F-68（Pluronic F-68®）和胆汁盐。吐温-80®和普朗尼克F-68是优选的。表面活性剂浓度优选的是约0.001%到约0.01%，更优选的约0.005%到约0.01%，最优选的约0.005%（重量/体积）。最优选的，表面活性剂是约0.005%的吐温-80®。

本发明的制剂除了乳糖酸之外可以含有一种或多种稳定剂。稳定剂有助于阻止抗体的凝聚和降解。适合的稳定剂包括但不限于多羟基糖类、糖醇、糖类衍生物和氨基酸。优选的稳定剂包括但不限于甘氨酸、海藻糖、甘露醇和蔗糖。在优选的实施方案中，其他稳定剂是甘氨酸，或甘氨酸和甘露醇两者。每种附加稳定剂的浓度优选的是约0.1%到约2%，更优选的约1%到约2%，最优选的约2%。特别优选的附加稳定剂是1.875%

的甘氨酸。

稳定剂和表面活性剂可以单独或相互联合使用来帮助稳定抗体溶液。在一个优选的实施方案中，本发明提供了稳定的冻干制剂，所述制剂包含约 50 mg/mL 到约 140 mg/mL 的 ERBITUX®、约 0.125%乳糖酸、pH 值约 6.0 的约 25 mM 组氨酸缓冲剂、约 0.005% 吐温-80®以及约 1.875% 甘氨酸。

冻干过程能够产生使蛋白质或多肽变性的各种压力。这些压力包括温度降低、冰晶形成、离子强度升高、pH 值变化、相分离、水化层的去除和浓度变化。对于冷冻和/或干燥过程的压力敏感的抗体可以通过添加一种或多种冷冻保护剂和/或冻干保护剂来稳定。冷冻保护剂或冻干保护剂可以是，例如，糖类，如蔗糖或海藻糖；氨基酸，如谷氨酸单钠或组氨酸；甲胺，如甜菜碱；易溶盐，如硫酸镁；多元醇，如三元醇或更高级的糖醇，如甘油、赤藓醇、甘醇、阿拉伯醇、木糖醇、山梨醇和甘露醇；丙二醇；聚乙二醇；普朗尼克；以及其组合。优选的溶保护剂的实例包括但不限于如上所述的稳定剂和表面活性剂。

本发明还提供了治疗方法，所述方法包括施用重新配制的制剂。重新配制的制剂通过用例如 1 mL 百万级质量的（milliQ）水来重新配制本发明冻干制剂而进行制备。重新配制时间优选的少于 1 分钟。如上所述对于抗体浓度，在特定的实施方案中，稳定的冻干制剂是用液体进行重新配制以形成具有比冻干前的制剂的抗体浓度高约 1-10 倍的抗体浓度的浓缩的重新配制的制剂。浓缩的重新配制的制剂可以灵活施用。例如，重新配制的制剂可以以稀释形式静脉内施用，或可以以更为浓缩的形式通过注射来施用。本发明浓缩的重新配制的制剂可以被稀释到适合于特定受试者和/或特定施用途径的浓度。因而，本发明提供了治疗方法，所述方法包括向有需要的哺乳动物、特别是人类施用治疗有效量的抗-EGFR 抗体。在此使用的术语施用是指通过可以实现想要的结果的任何方式向哺乳动物递送本发明的抗体。例如，它们可以静脉内或肌内注射施用。在一个实施方案中，浓缩的重新配制的制剂通过注射施用。

治疗有效量是指本发明的抗体的数量，当向哺乳动物施用时，在产

生期望的治疗效果，例如中和 EGFR 活性、抑制肿瘤生长或治疗非癌性超增殖性疾病方面是有效的。如上所述的抗体可以与其他抗体或任何常规的治疗剂，例如抗赘生试剂联合施用。

通过以下的非限制性实例进一步描述本发明。任何引用的参考文献通过引用合并在此，包括 Sambrook J，Fritsch EF，Maniatis T.《*Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*》普莱恩威尔，NY: 冷泉港实验室出版社; 1989。

附图说明

附图 1 显示了在存在和不存在吐温-80®的情况下西妥昔单抗作为时间函数的浊度。

附图 2 显示了在 50℃培养 72 小时之后各种制剂条件下的西妥昔单抗溶液的浊度。

附图 3 显示了在 50℃培养 72 小时之后各种制剂条件下的西妥昔单抗原料损失的百分比。

附图 4 显示了在 50℃培养 72 小时之后各种制剂条件下的西妥昔单抗的单体百分比。

附图 5 显示了在 50℃培养 72 小时之后各种制剂条件下的西妥昔单抗的可溶凝聚物的百分比。

附图 6 显示了在 50℃培养 72 小时之后各种制剂条件下的西妥昔单抗的降解物的百分比。

附图 7 显示了变化的培养时间下各种重新配制的西妥昔单抗冻干产品的浊度。

附图 8 显示了不同培养时间下的各种重新配制的西妥昔单抗冻干产品的单体百分比。

附图 9 显示了不同培养时间下的各种重新配制的 MAb 西妥昔单抗冻干产品的可溶凝聚物的百分比。

附图 10 显示了不同培养时间下的各种重新配制的西妥昔单抗冻干产品的降解物的百分比。

具体实施方式

实施例 1：凝聚研究

考虑了最后冻干西妥昔单抗的稳定性。制备磷酸盐缓冲盐水（PBS）中的西妥昔单抗（5 mg/mL）的溶液和含有 0.01% 吐温-80®的 PBS 中西妥昔单抗（5 mg/mL）的溶液。每种溶液（3 mL）在 4℃ 60 rpm 振摇。在 540 nm 处测量溶液的浊度。结果在附图 1 中示出，为标绘每种溶液的浊度相对时间的曲线图。在缺乏吐温-80®时，浊度随着时间增加。在存在吐温-80®（0.01%）时，浊度保持不变。因而，0.01%的吐温-80®最小化了气-水界面处西妥昔单抗的凝聚。

实施例 2：实时溶液稳定性

溶液中西妥昔单抗的实时稳定性通过改变缓冲剂和赋形剂来测量。西妥昔单抗（2 mg/mL）的各种溶液使用以下每一种缓冲剂（25 mM）在 pH 6.0 下制备：

（ i ）苹果酸盐，

（ ii ）组氨酸，

（iii）酒石酸盐，

（iv）琥珀酸盐，和

（ v ）醋酸盐。

对于每种缓冲剂，制备具有以下赋形剂的溶液：

（ i ）0.01% 吐温-80®；

（ ii ）0.01% 吐温-80®和 0.25% 乳糖酸；

（iii）0.01% 吐温-80®、0.25%乳糖酸和 2%甘氨酸；

（iv）0.01% 吐温-80®和 2% 蔗糖；

（ v ）0.01% 吐温-80®、2%蔗糖和 2% 甘氨酸；

（vi）0.01% 吐温-80®和 2%海藻糖；

（vii）0.01% 吐温-80®、2%海藻糖和 2% 甘氨酸。

在 50℃培养各种溶液 72 小时。

在 540 nm 处测量浊度。附图 2 显示了在 50℃培养 72 小时之后在各种制剂条件下的浊度。溶液浊度在组氨酸缓冲液中是最小的，在酒石酸盐缓冲液中是最高的。0.01% 吐温-80®、2%糖类（蔗糖或海藻糖）以及 2%甘氨酸的赋形剂组合降低了所有缓冲剂中的浊度。单独的 0.25%乳糖酸不具有多少效果，但是与 2%甘氨酸一起，它降低了所有缓冲剂中的溶液的浊度。

SEC-HPLC 分析被用于测量单体、凝聚物和降解物部分的含量。材料损失百分比通过计算起始样品和在 50℃培养 72 小时后的样品之间的总峰面积的差异来估计。附图 3 显示了在 50℃培养 72 小时之后在各种制剂条件下材料损失的百分比。材料损失的百分比在酒石酸盐缓冲剂中是最大的，在组氨酸缓冲剂中是最小的。

附图 4 显示了在 50℃培养 70 小时之后在各种制剂条件下西妥昔单抗的单体的百分比。单体的百分比在酒石酸盐缓冲剂中是最小的，在组氨酸缓冲剂中是最大的。pH6.0、含有 25 mM 组氨酸和 2%糖类（海藻糖或蔗糖）和 0.25%乳糖酸、2%甘氨酸和 0.01% 吐温®的具有最高的单体百分比。

附图 5 显示了在 50℃培养 72 小时之后在各种制剂条件下西妥昔单抗的可溶性凝聚物的百分比。可溶凝聚物的百分比在酒石酸盐缓冲剂中是最大的，在苹果酸盐缓冲剂中是最小的。

附图 6 显示了在 50℃培养 72 小时之后在各种制剂条件下西妥昔单抗的降解物的百分比。降解物的百分比对于所有缓冲剂都低于 1%，只是在酒石酸盐缓冲剂中它达到 5%。

实施例 3：冻干工艺

通过添加以下赋形剂制备 pH 6.0 的组氨酸缓冲剂（25 mM）中西妥昔单抗（50 mg/mL）的各种溶液：

（ i ）2%甘氨酸和 0.005% 吐温-80®；

（ ii ）2%海藻糖和 0.005%吐温-80®；

（iii）2%甘露醇和 0.005%吐温-80®;

（iv）1.875%甘氨酸、0.125%乳糖酸和 0.005%吐温-80®;

（v）2%蔗糖和 0.005%吐温-80®;

（vi）1%甘氨酸、1%海藻糖和 0.005%吐温-80®;

（vii）1%甘氨酸、1%蔗糖和 0.005%吐温-80®;

（viii）1%甘氨酸、1%甘露醇和 0.005%吐温-80®。

1 毫升的每种溶液被冻干，然后用 1 mL 或更少的百万级质量（milliQ）的水进行重新配制，以得到 50 mg/mL 或高达 200 mg/mL 的终浓度。对于每种样品，重新配制的时间少于 1 分钟，重新配制的溶液是无颗粒的。

为了测试冻干溶液的长期稳定性，每种冻干的制剂的样品在 60℃培养 4 天，另一种样品在 60℃培养 11 天。初始的冻干样品没有培养。用 1 mL 百万级质量（milliQ）的水重新配制初始的冻干样品和培养的样品。对于所有的样品，重新配制的时间少于 1 分钟，溶液是澄清的。

在 350nm 处测量浊度。附图 7 显示了在起始阶段、在 60℃培养 4 天后、在 60℃培养 11 天后各种重新配制的西妥昔单抗冻干制品的浊度。所有的初始样品的浊度是可比较的。所有制剂的浊度随着培养时间而提高。重新配制后的含有 25 mM 组氨酸、pH 6.0、具有 1.875%甘氨酸、0.125%乳糖酸和 0.005% 吐温-80®的制剂的溶液浊度变化最小。

SEC-HPLC 分析被用于测量单体、凝聚物和降解物部分的含量。SEP-HPLC 分析表明每种样品显示没有不溶凝聚物。

附图 8 显示了在起始阶段、在 60℃培养 4 天之后、在 60℃培养 11 天之后重新配制的西妥昔单抗冻干制品的单体百分比。起初，所有的制剂的单体百分比是相似的。在所有制剂中单体百分比随着培养时间而降低。单体百分比损失最小是含有 25 mM 组氨酸、2%甘氨酸和 0.005% 吐温-80®、pH 6.0 制剂，以及含有 25 mM 组氨酸、2%蔗糖和 0.005%吐温-80®、pH 6.0 的制剂。

附图 9 显示了在初始阶段、在 60℃培养 4 天后、在 60℃培养 11 天之后重新配制的西妥昔单抗冻干制品中的可溶凝聚物百分比的变化。起初，凝聚物百分比在所有制剂中是相似的。凝聚物百分比在所有制剂中

随着培养时间而升高。在 4 天和 11 天培养时间之后，含 25 mM 组氨酸、1.875%甘氨酸、0.125%乳糖酸和 0.005% 吐温-80®、pH 6.0 的制剂中的凝聚物百分比是最小的。含有 25 mM 组氨酸、2%甘氨酸和 0.005%吐温-80®、pH 6.0 的制剂，以及含有 25mM 组氨酸、2%蔗糖和 0.005%吐温-80®、pH 6.0 的制剂中的凝聚物百分比是最大的。

附图 10 显示了在初始阶段、在 60℃培养 4 天后、在 60℃培养 11 天之后重新配制的冻干西妥昔单抗的降解物的百分比。在培养之前，含有 25 mM 组氨酸、2%甘露醇和 0.005% 吐温-80®的制剂的初始样品中的降解物的百分比是最小的。除了含有 25 mM 组氨酸、2%蔗糖和 0.005% 吐温-80®、pH 6.0 的制剂之外，所有其他的制剂条件在 60℃培养 4 和 11 天之后具有相似的降解物。含有 25 mM 组氨酸、2%蔗糖和 0.005%吐温-80®、pH 6.0 的制剂的降解百分比稍微更高。

<110> 埃姆克隆系统股份有限公司(IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED)

米尔·阿加尔赫达(AGARKHED, Meera)

阿尔温德·斯里瓦斯塔瓦(SRIVASTAVA, Arvind)

乔尔·戈尔茨坦(GOLDSTEIN, Joel)

<120> 抗-EGFR 抗体的冻干制剂

<130> FPIV080828ZX

<140> PCT/US07/71119

<141> 2007-06-13

<150> US 60/813,958

<151> 2006-06-14

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1350

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1350)

<400> 1

cag gtg cag ctg aag cag tca gga cct ggc cta gtg cag ccc tca cag 48
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

agc ctg tcc atc acc tgc aca gtc tct ggt ttc tca tta act aac tat 96
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

ggt gta cac tgg gtt cgc cag tct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg 144
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

gga gtg ata tgg agt ggt gga aac aca gac tat aat aca cct ttc aca 192
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

tcc aga ctg agc atc aac aag gac aat tcc aag agc caa gtt ttc ttt 240
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

aaa atg aac agt ctg caa tct aat gac aca gcc ata tat tac tgt gcc 288
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

aga gcc ctc acc tac tat gat tac gag ttt gct tac tgg ggc caa ggg 336
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

act ctg gtc act gtc tct gca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc 384
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg 432
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg 480
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta 528
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc 576
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc 624
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa 672

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg 720

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc 768

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac 816

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat 864

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg 912

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag 960

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa 1008

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc 1056

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc 1104
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag 1152
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg 1200
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag 1248
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag 1296
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt 1344
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

aaa tga 1350
Lys

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 2

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

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

Lys

<210> 3

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(645)

<400> 3

gac atc ttg ctg act cag tct cca gtc atc ctg tct gtg agt cca gga 48
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg gcc agt cag agt att ggc aca aac 96
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

ata cac tgg tat cag caa aga aca aat ggt tct cca agg ctt ctc ata 144
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

aag tat gct tct gag tct atc tct ggg atc cct tcc agg ttt agt ggc 192
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tca ggg aca gat ttt act ctt agc atc aac agt gtg gag tct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

gaa gat att gca gat tat tac tgt caa caa aat aat aac tgg cca acc 288
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga act gtg gct gca 336
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

ttc aac agg gga gag tgt tag 645
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 4

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 5

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(57)

<400> 5

atg gct gtc ttg ggg ctg ctc ttc tgc ctg gtg aca ttc cca agc tgt 48

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1 5 10 15

gtc cta tcc 57

Val Leu Ser

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 6

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 7

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(60)

<400> 7

atg gta tcc aca cct cag ttc ctt gta ttt ttg ctt ttc tgg att cca 48

Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro

1 5 10 15

gcc tcc aga agt 60

Ala Ser Arg Ser

20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 8

Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15

Ala Ser Arg Ser
20

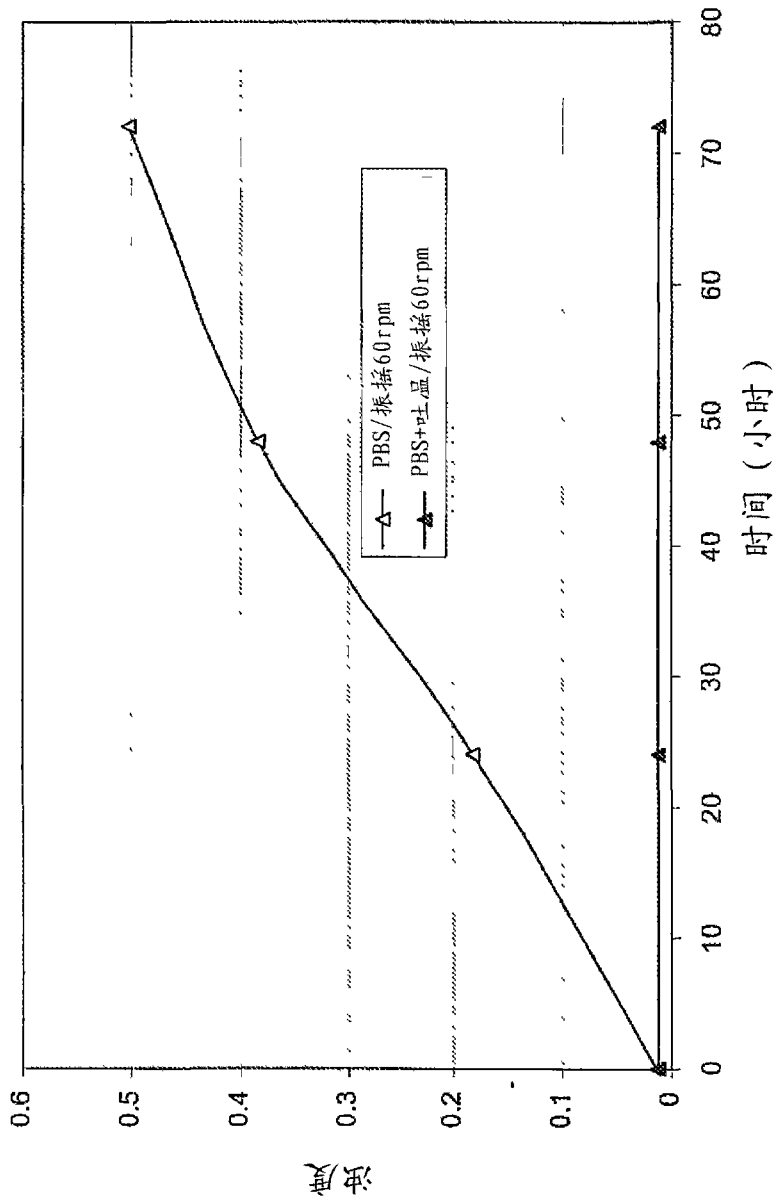

0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
时间（小时）
PBS/振摇60rpm
PBS+吐温/振摇60rpm

图1

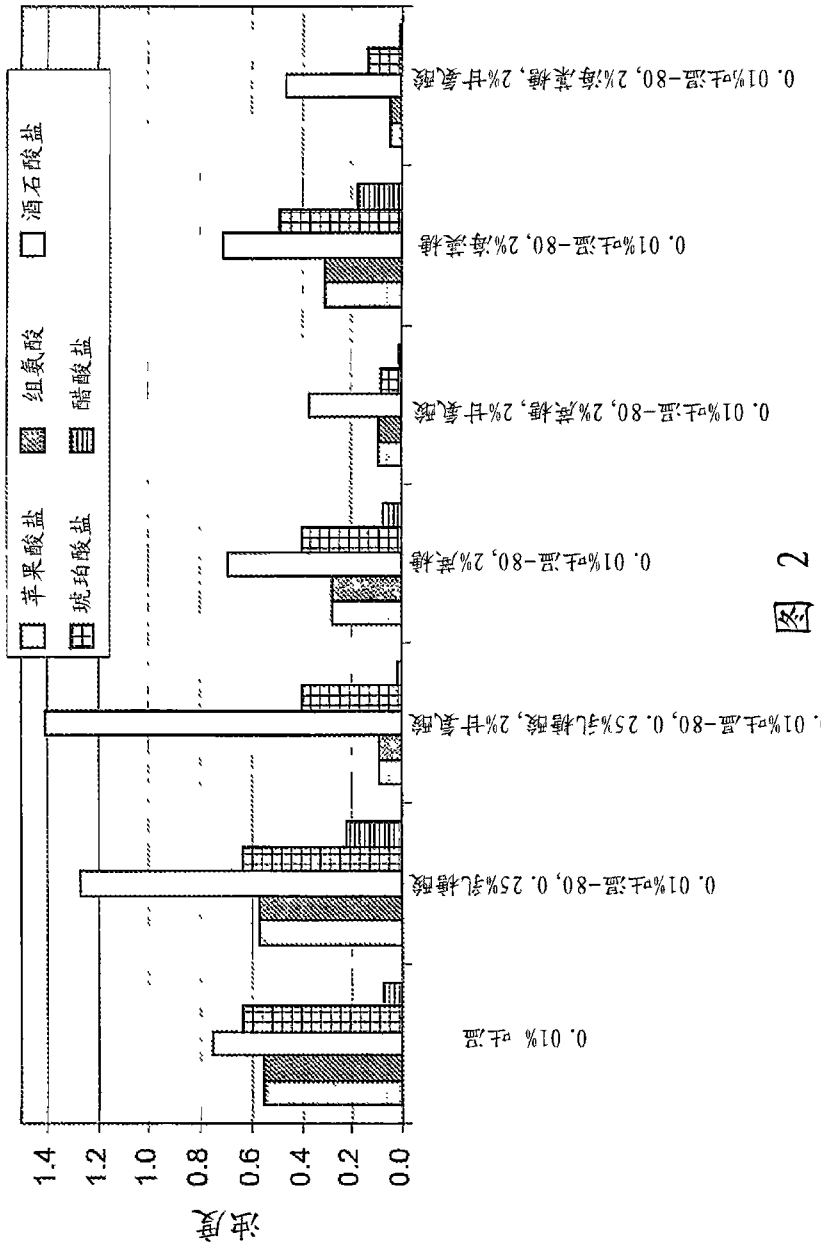

浊度
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
苹果酸盐
琥珀酸盐
组氨酸
醋酸盐
酒石酸盐
0.01%吐温
0.01%吐温-80, 0.25%乳糖酸
0.01%吐温-80, 0.25%乳糖酸, 2%甘氨酸
0.01%吐温-80, 2%蔗糖
0.01%吐温-80, 2%蔗糖, 2%甘氨酸
0.01%吐温-80, 2%海藻糖
0.01%吐温-80, 2%海藻糖, 2%甘氨酸

图 2

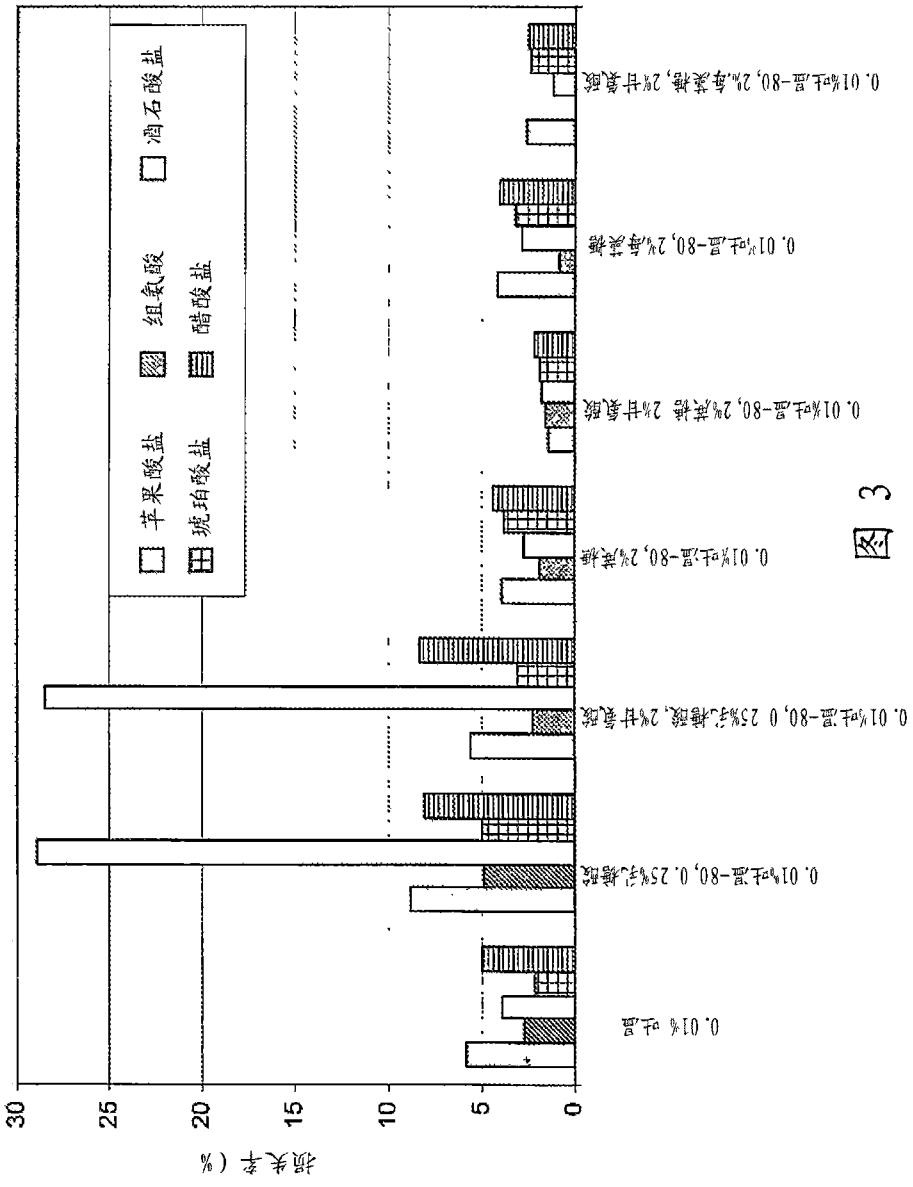

损失率（%）
0
5
10
15
20
25
30
苹果酸盐
琥珀酸盐
组氨酸
醋酸盐
酒石酸盐
0.01%吐温
0.01%吐温-80，0.25%羟脯酸
0.01%吐温-80，0.25%羟脯酸，2%甘氨酸
0.01%吐温-80，2%蔗糖
0.01%吐温-80，2%蔗糖 2%甘氨酸
0.01%吐温-80，2%海藻糖
0.01%吐温-80，2%海藻糖，2%甘氨酸

图 3

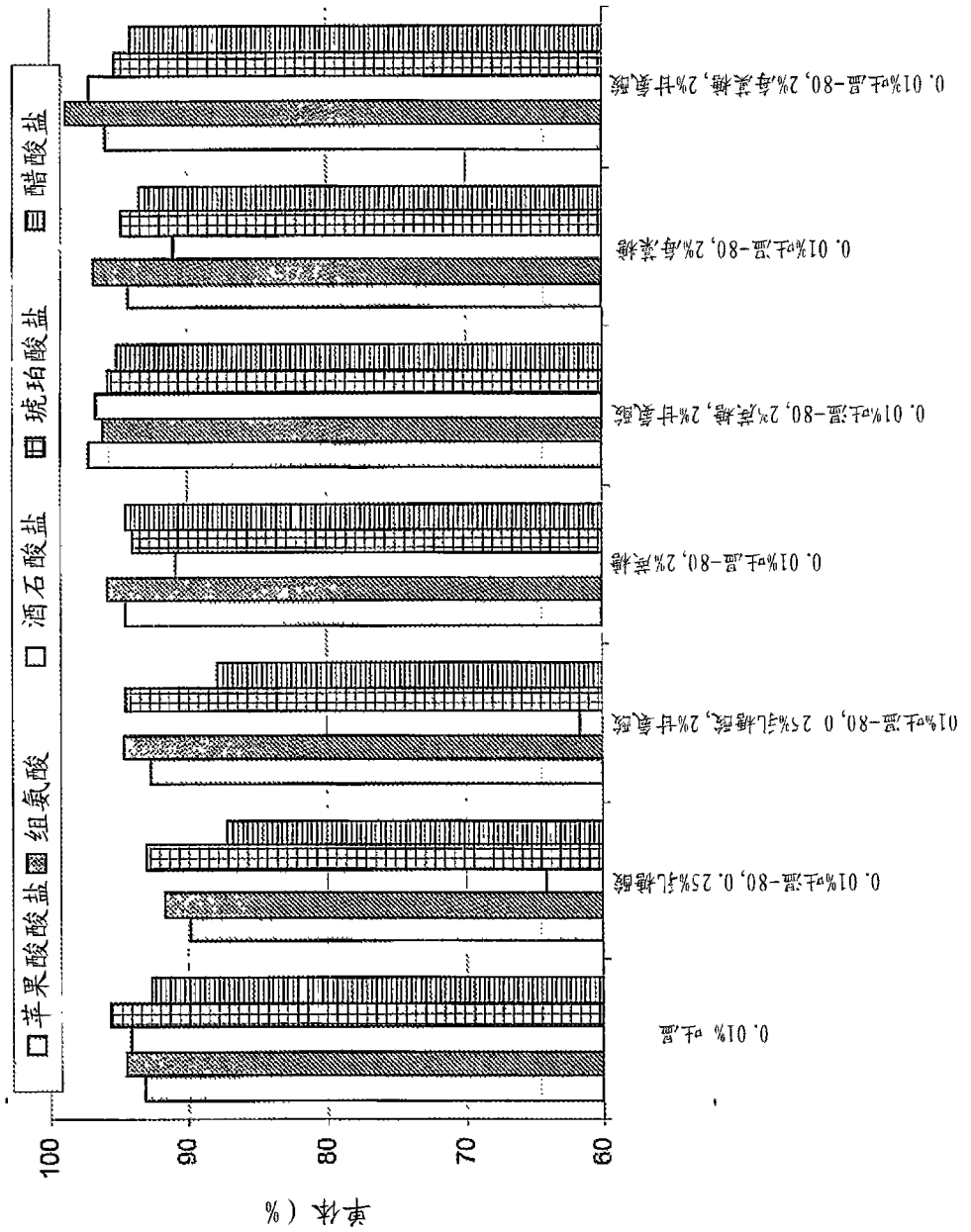

苹果酸酸盐
组氨酸
酒石酸盐
琥珀酸盐
醋酸盐
单体（%）
100
90
80
70
60
0.01% 吐温
0.01%吐温-80，0.25%乳糖酸
0.01%吐温-80，0.25%乳糖酸，2%甘氨酸
0.01%吐温-80，2%蔗糖
0.01%吐温-80，2%蔗糖，2%甘氨酸
0.01%吐温-80，2%身蒸糖
0.01%吐温-80，2%身蒸糖，2%甘氨酸

图 4

凝聚物（%）
0
1
2
3
4
5
6
7
苹果酸盐
琥珀酸盐
组氨酸
醋酸盐
酒石酸盐
0.01% 吐温
0.01%吐温-80，0.25%乳糖醇
0.01%吐温-80，0.25%乳糖醇，2%甘氨酸
0.01%吐温-80，2%蔗糖
0.01%吐温-80，2%蔗糖，2%甘氨酸
0.01%吐温-80，2%身蒸糖
0.01%吐温-80，2%身蒸糖，2%甘氨酸

图 5

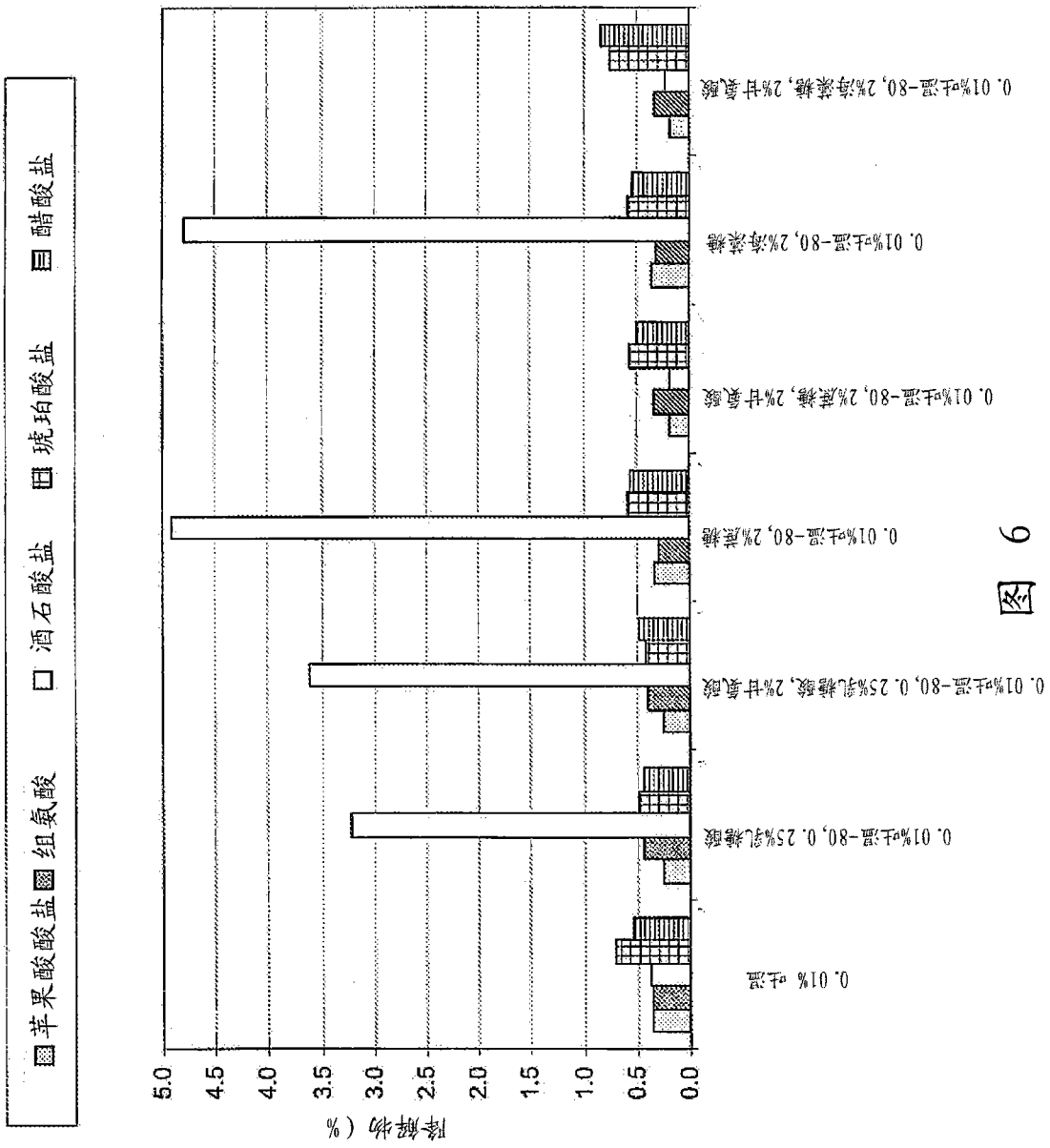

苹果酸酸盐
组氨酸
酒石酸盐
琥珀酸盐
醋酸盐
降解物（%）
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01% pH温
0.01%pH温-80, 0.25%乳糖酸
0.01%pH温-80, 0.25%乳糖酸, 2%甘氨酸
0.01%pH温-80, 2%蔗糖
0.01%pH温-80, 2%麦芽糖, 2%甘氨酸
0.01%pH温-80, 2%海藻糖
0.01%pH温-80, 2%海藻糖, 2%甘氨酸

图 6

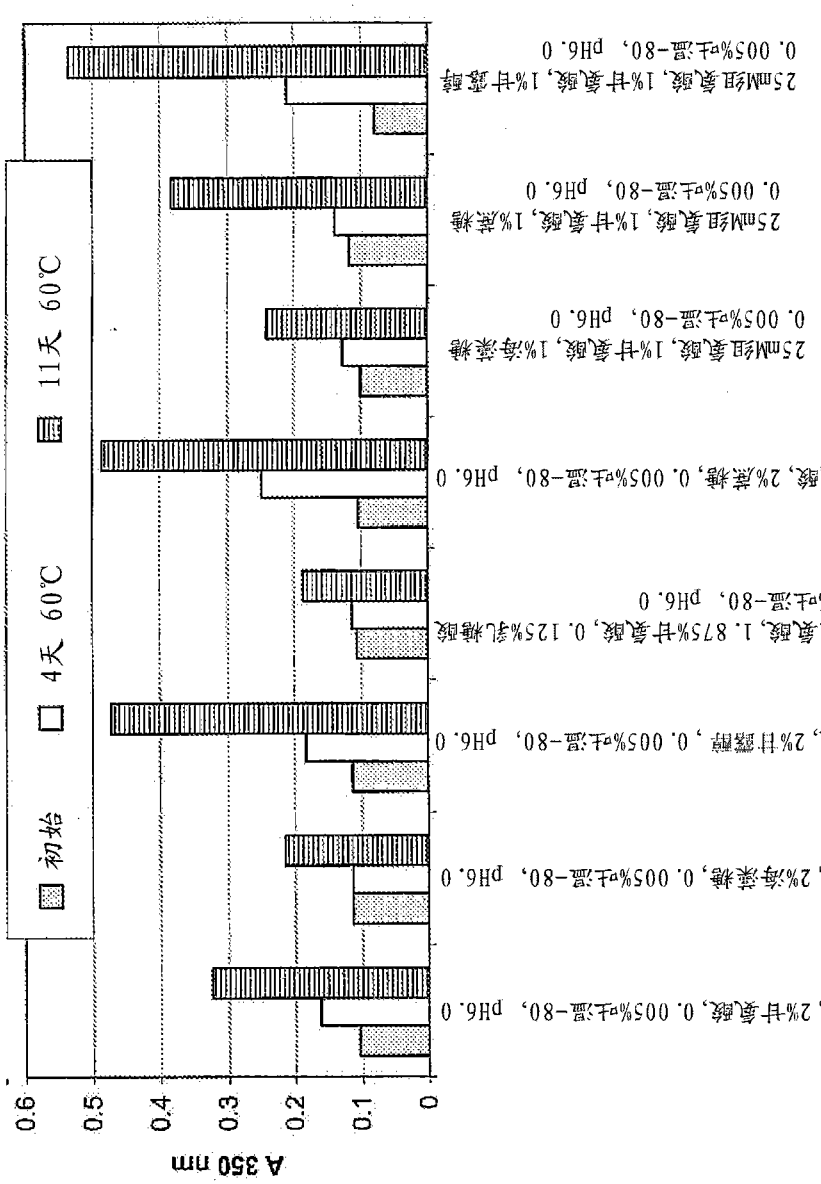

A 350 nm
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
初始
4天 60℃
11天 60℃
25mM组氨酸, 2%甘氨酸, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%海藻糖, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%甘露醇, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1.875%甘氨酸, 0.125%乳糖酸
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%蔗糖, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%海藻糖
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%蔗糖
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%甘露醇
0.005%吐温-80, pH6.0

图 7

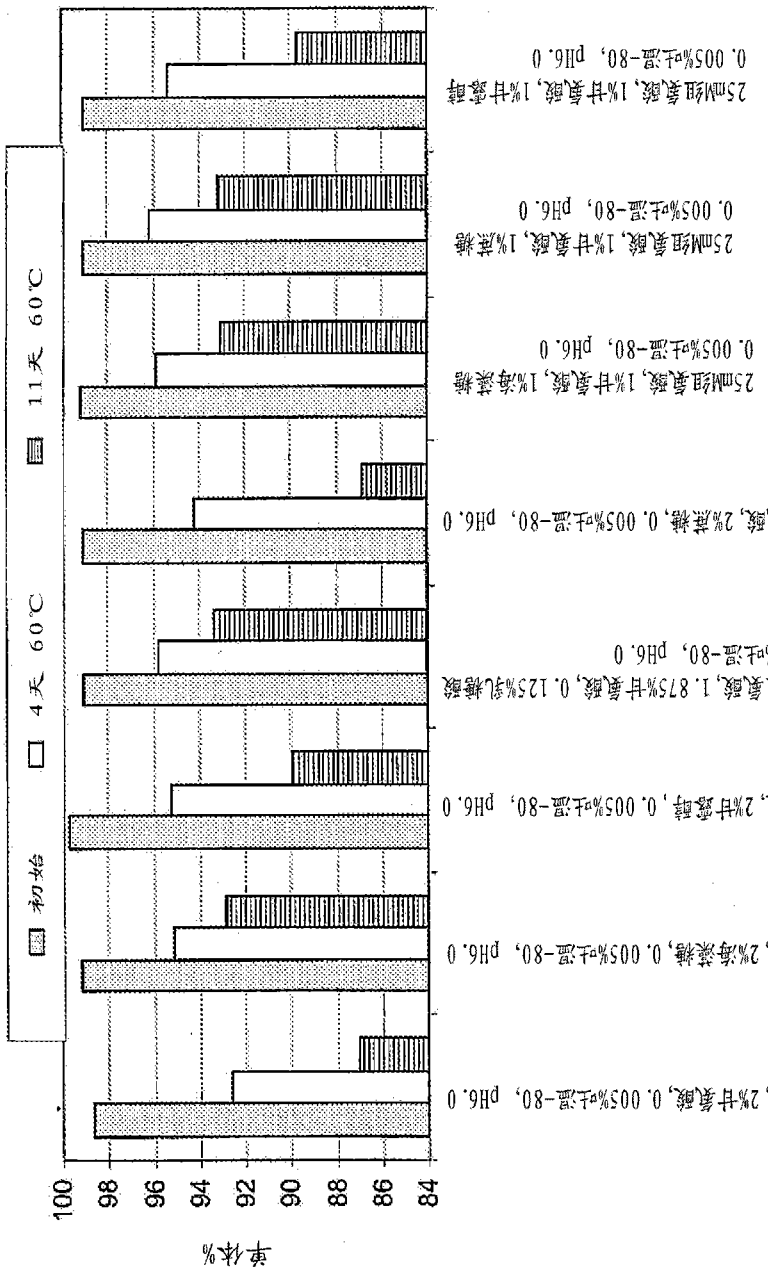

单体%
100
98
96
94
92
90
88
86
84
初始
4天 60℃
11天 60℃
25mM组氨酸, 2%甘氨酸, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%海藻糖, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%甘露醇, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1.875%甘氨酸, 0.125%乳糖酸
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%蔗糖, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%海藻糖
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%蔗糖
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%甘露醇
0.005%吐温-80, pH6.0

图 8

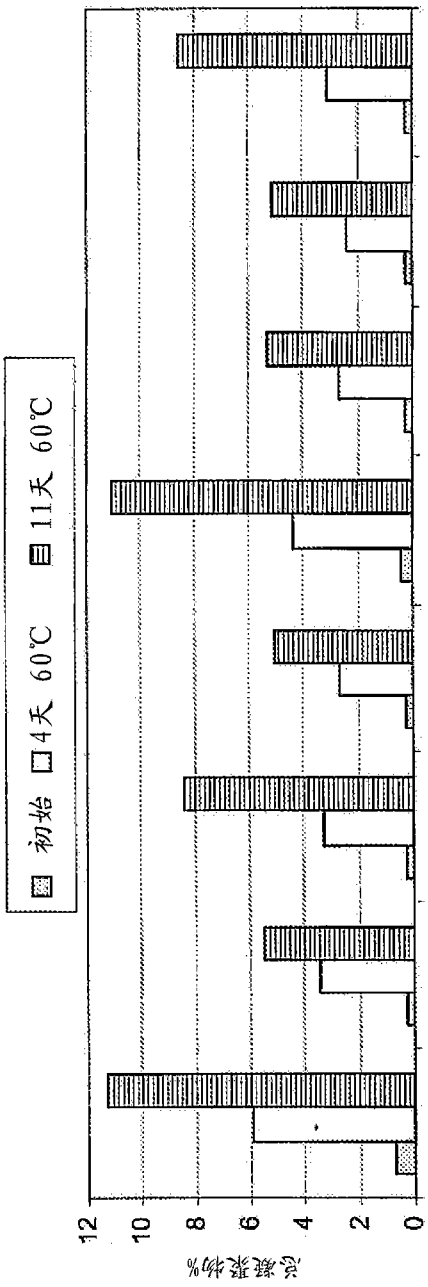

总凝聚物%
0
2
4
6
8
10
12
初始
4天 60℃
11天 60℃
25mM组氨酸, 2%甘氨酸, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%海藻糖, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%甘露醇, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1.875%甘氨酸, 0.125%乳糖酸
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%蔗糖, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%海藻糖
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%蔗糖
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%甘露醇
0.005%吐温-80, pH6.0

图 9

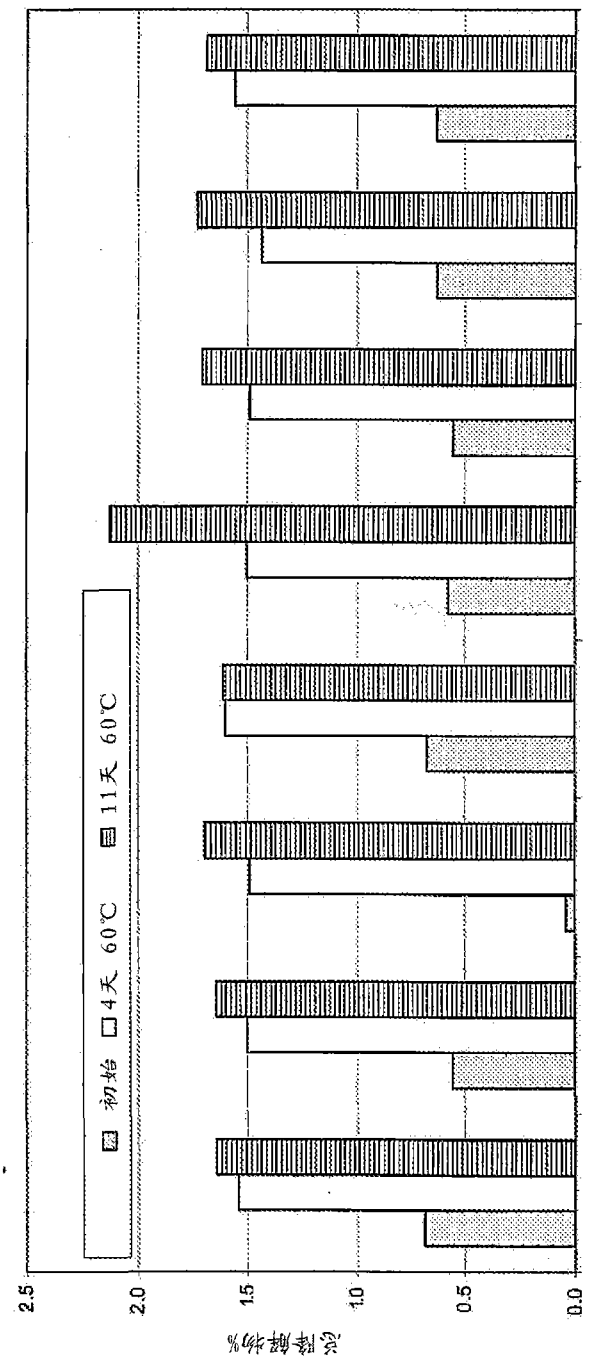

总降解物%
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
初始
4天 60℃
11天 60℃
25mM组氨酸, 2%甘氨酸, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%海藻糖, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%甘露醇, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1.875%甘氨酸, 0.125%乳糖酸
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 2%蔗糖, 0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%海藻糖
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%蔗糖
0.005%吐温-80, pH6.0
25mM组氨酸, 1%甘氨酸, 1%甘露醇
0.005%吐温-80, pH6.0

图10