(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115996748 A
(43)申请公布日 2023.04.21

(21)申请号 202180046732.2
(22)申请日 2021.05.28
(30)优先权数据
62/704,831 2020.05.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.12.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/035011 2021.05.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/243298 EN 2021.12.02
(71)申请人 奇努克医疗公司
地址 美国华盛顿
申请人 艾杜罗生物科技欧洲控股有限责任公司
(72)发明人 T·范德拉尔 S·霍纳曼 J·杜洛斯 E·德科克
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 陈艳娟 王艳波
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书61页 附图44页

(54)发明名称

用APRIL结合抗体治疗IgA肾病的方法

(57)摘要

本发明涉及结合人APRIL的抗体的配制物和用途，用于治疗与IgA过度产生或沉积相关的病况，包括IgA肾病。

样品		H75浓度(mg/mL) 浊度(A330) 视觉外观/pH														
			-70℃		2-8℃				25℃				45℃		F/T	2-8℃
		t=0	t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	5个循环	振动3天
10mM组氨酸	150mM精氨酸，150mM谷氨酸，0.01% PS20，pH 6.1	159 0.703 C,Y,NP 6.13	151 0.785 C,Y,NP 6.14	154 0.694 C,Y,NP 6.15	160 0.704 C,Y,NP 6.12	159 0.700 C,Y,NP 6.16	148 0.745 C,Y,NP 6.16	141 0.709 C,Y,NP 6.15	159 0.763 C,Y,NP 6.12	150 0.763 C,Y,NP 6.15	149 0.838 C,Y,NP 6.16	142 0.833 C,Y,NP 6.14	156 0.837 C,Y,NP 6.13	157 0.920 C,Y,NP 6.14	150 0.684 C,Y,NP 6.14	147 0.655 C,Y,NP 6.13
	55mM精氨酸，55mM谷氨酸，3%山梨醇，0.01% PS20，pH 6.3	162 0.708 C,Y,NP 6.34	145 0.729 C,Y,NP 6.35	148 0.720 C,Y,NP 6.34	151 0.739 C,Y,NP 6.31	158 0.733 C,Y,NP 6.34	155 0.725 C,Y,NP 6.34	148 0.731 C,Y,NP 6.33	167 0.721 C,Y,NP 6.33	158 0.840 C,Y,NP 6.31	155 0.834 C,Y,NP 6.33	150 0.842 C,Y,NP 6.31	156 0.854 C,Y,NP 6.3	147 0.969 C,Y,P 6.33	153 0.699 C,Y,NP 6.32	144 0.678 C,Y,NP 6.34
	150mM精氨酸，150mM谷氨酸，0.01% PS20，pH 6.3	162 0.753 C,Y,NP 6.36	154 0.778 C,Y,NP 6.32	150 0.758 C,Y,NP 6.34	157 0.759 C,Y,NP 6.31	163 0.756 C,Y,NP 6.34	155 0.790 C,Y,NP 6.34	149 0.758 C,Y,NP 6.34	165 0.768 C,Y,NP 6.32	168 0.797 C,Y,NP 6.31	154 0.867 C,Y,NP 6.35	149 0.936 C,Y,NP 6.34	166 0.891 C,Y,NP 6.32	152 1.081 C,Y,P 6.33	163 0.746 C,Y,NP 6.32	158 0.707 C,Y,NP 6.35
	75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01% PS20，pH 6.1	165 0.753 C,Y,NP 6.14	152 0.795 C,Y,NP 6.15	154 0.763 C,Y,NP 6.14	171 0.758 C,Y,NP 6.12	169 0.763 C,Y,NP 6.15	156 0.793 C,Y,NP 6.13	148 0.763 C,Y,NP 6.13	167 0.750 C,Y,NP 6.11	174 0.847 C,Y,NP 6.11	157 0.843 C,Y,NP 6.12	156 0.838 C,Y,NP 6.12	160 0.961 C,Y,NP 6.09	159 1.024 C,Y,NP 6.13	160 0.735 C,Y,NP 6.13	158 0.702 C,Y,NP 6.14

CN 115996748 A

1.一种适用于药物输注或皮下注射的抗体配制物,所述抗体配制物包含:

浓度为约20mg/mL至约190mg/mL的抗APRIL抗体;

约10mM L-组氨酸;

约75mM L-精氨酸;

约3%重量%山梨醇;

约0.01重量%聚山梨醇酯20;以及

约6.0至约6.6的pH;

其中所述配制物(i)具有约16cP或更低的粘度,(ii)不包含谷氨酸或其盐,(iii)具有约250mOsm/kg至约390mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度,以及(iv)具有小于约1.0的OD330。

2.根据权利要求1所述的抗体配制物,其中在制造所述配制物后,所述配制物在2-8℃下储存9个月后保持所述抗APRIL抗体的至少96%纯度。

3.根据权利要求2所述的抗体配制物,其中在制造所述配制物后,所述配制物在25℃下储存6个月后保持所述抗APRIL抗体的至少95%纯度。

4.根据权利要求1至3中的一项所述的抗体配制物,其中所述配制物具有在25℃下测量的2.5×10^{-5}mol·mL/g^2或更大的第二维里系数。

5.根据权利要求1至4中的一项所述的抗体配制物,其中所述配制物具有约7.4或更高的计算等电点。

6.根据权利要求1至5中的一项所述的抗体配制物,其中所述配制物中的所述抗APRIL抗体的浓度为约150mg/mL。

7.根据权利要求6所述的抗体配制物,其中所述配制物具有约290mOsm/kg至约390mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度。

8.根据权利要求6或7中的一项所述的抗体配制物,其中所述配制物具有约0.8或更小的OD330。

9.根据权利要求1至5中的一项所述的抗体配制物,其中所述抗APRIL抗体的浓度为约20mg/mL。

10.根据权利要求9所述的抗体配制物,其中所述配制物具有约293mOsm/kg至约333mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度。

11.根据权利要求1至10中的一项所述的抗体配制物,其中所述抗APRIL抗体是人源化抗体,所述人源化抗体包含选自由以下组成的组的重链可变区.轻链可变区对:VH11.VL15、VH12.VL15、VH13.VL15、VH14.VL15、VH14_1.VL15、VH14_1C.VL15、VH14_1D.VL15、VH14_1E.VL15和VH14_1G.VL15。

12.根据权利要求1至11中的一项所述的抗体配制物,其中所述配制物不含甘氨酸、碳酸盐、HEPES、磷酸盐、柠檬酸盐和乙酸盐。

13.一种单次使用或多次使用小瓶,所述小瓶包含权利要求1至12中的一项所述的抗体配制物。

14.如权利要求13所述的单次使用或多次使用小瓶,所述小瓶含有0.5mL至50mL体积的所述配制物,所述配制物具有约20mg/mL至约190mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

15.如权利要求14所述的单次使用或多次使用小瓶,其中所述配制物具有约20mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

16.如权利要求14所述的单次使用或多次使用小瓶,其中所述配制物具有约150mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

17.如权利要求14至16中的一项所述的单次使用或多次使用小瓶,所述小瓶含有5mL体积的所述配制物。

18.一种预填充注射器、自动注射器或注射笔,其包含权利要求1至12中的一项所述的抗体配制物。

19.如权利要求18所述的预填充注射器、自动注射器或注射笔,其含有约0.5mL至约10mL体积的所述配制物,所述配制物具有约20mg/mL至约190mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

20.如权利要求19所述的预填充注射器、自动注射器或注射笔,其中所述配制物具有约20mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

21.如权利要求19所述的预填充注射器、自动注射器或注射笔,其中所述配制物具有约150mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

22.如权利要求19至21中的一项所述的预填充注射器、自动注射器或注射笔,其含有约2mL体积的所述配制物。

23.一种向有需要的个体施用抗APRIL抗体的方法,所述方法包括通过向所述个体皮下注射来施用权利要求1至12中的一项所述的配制物。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述方法包括以至少每周(QW)时间表重复所述施用至少2个施用周期。

25.根据权利要求23所述的方法,其中所述方法包括以至少每两周(Q2W)时间表重复所述施用至少2个施用周期。

26.根据权利要求23所述的方法,其中所述方法包括以至少每4周(Q4W)或每个月(QMT)时间表重复所述施用至少2个施用周期。

27.根据权利要求23至26中的一项所述的方法,其中每个给药事件施用总剂量为约10mg至约1350mg的所述抗APRIL抗体。

28.根据权利要求27所述的方法,其中每次施用递送约2mL浓度为约150mg/mL的所述抗APRIL抗体的所述配制物,并且每个给药事件包含一次或多次所述施用。

29.根据权利要求27所述的方法,其中每次施用递送约4mL浓度为约150mg/mL的所述抗APRIL抗体的所述配制物,并且每个给药事件包含一次或多次所述施用。

30.根据权利要求23至29中的一项所述的方法,其中将所述配制物皮下施用至所述个体的大腿、腹部或上臂中的部位。

31.一种向有需要的个体施用抗APRIL抗体的方法,所述方法包括通过向所述个体静脉内输注来施用权利要求1至12中的一项所述的配制物。

32.根据权利要求31所述的方法,其中所述方法包括以至少QW时间表重复所述施用至少2个施用周期。

33.根据权利要求31所述的方法,其中所述方法包括以至少Q2W时间表重复所述施用至少2个施用周期。

34.根据权利要求31所述的方法,其中所述方法包括以至少Q4W或每月时间表重复所述施用至少2个施用周期。

35.根据权利要求31至34中任一项所述的方法,其中所述静脉内输注包括:

将权利要求1至12中的一项所述的配制物在0.9%盐水中稀释至约0.1mg/mL至约10mg/mL的浓度;以及

在约2小时的时间段内以单次静脉内剂量的所述稀释配制物向所述个体施用总剂量为约10mg至约1350mg的所述抗APRIL抗体。

36.根据权利要求35所述的方法,其中将15mL浓度为20mg/mL的所述配制物添加至235mL 0.9%盐水中以提供浓度为1.2mg/mL的所述静脉内剂量。

37.一种向有需要的个体施用抗APRIL抗体的方法,所述方法包括通过负荷/维持施用方案施用抗APRIL。

38.根据权利要求37所述的方法,其中所述负荷/维持施用方案的所述负荷部分包括以比所述负荷/维持施用方案的所述维持部分中的抗APRIL抗体浓度更高的浓度一次或多次施用所述抗APRIL抗体。

39.根据权利要求37所述的方法,其中所述负荷/维持施用方案的所述负荷部分包括以比所述负荷/维持施用方案的所述维持部分中的所述抗APRIL抗体的施用频率更高的频率一次或多次施用所述抗APRIL抗体。

40.根据权利要求37至39中的一项所述的方法,其中所述负荷/维持施用方案的所述负荷部分包括以与所述负荷/维持施用方案的所述维持部分中的所述抗APRIL抗体的施用途径不同的途径一次或多次施用所述抗APRIL抗体。

41.根据权利要求37所述的方法,其中所述负荷/维持给药方案的所述负荷部分包括一次或多次静脉内施用所述抗APRIL抗体,并且所述负荷/维持施用方案的所述维持部分包括一次或多次皮下施用所述抗APRIL抗体。

42.根据权利要求37至41中的一项所述的方法,其中所述抗APRIL抗体是根据权利要求1至12中的一项所述的抗体配制物。

43.根据权利要求23至41中的一项所述的方法,其中所述有需要的个体具有大于4g/L的血清IgA水平。

44.根据权利要求23至41中的一项所述的方法,其中所述有需要的个体是IgA肾病患者。

45.根据权利要求23至41中的一项所述的方法,其中所述个体患有高免疫球蛋白血症。

用APRIL结合抗体治疗IgA肾病的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2020年5月29日提交的美国临时申请序列号62/704,831的权益,从所述临时申请要求优先权,并以引用方式将其整体并入本文,包括所有表格、附图和权利要求书。

发明领域

[0003] 本发明涉及结合人APRIL的分离的抗体,包括其片段用于治疗IgA肾病的用途。

[0004] 发明背景

[0005] APRIL表达为II型跨膜蛋白,但与大多数其它TNF家族成员不同,它主要作为分泌蛋白加工并在高尔基体中被裂解,它在高尔基体中被弗林蛋白酶转化酶裂解以释放可溶性活性形式(Lopez-Fraga等人,2001,EMBO Rep 2:945-51)。APRIL组装为非共价连接的同源三聚体,在蛋白质折叠中具有与许多其它TNF家族配体相似的结构同源性(Wallweber等人,2004,Mol Biol 343,283-90)。APRIL结合两种TNF受体:B细胞成熟抗原(BCMA)和跨膜活化剂和钙调节剂以及亲环蛋白配体相互作用物(TACI)(综述于Kimberley等人,2009,J Cell Physiol.218(1):1-8中)。另外,最近已显示APRIL可结合硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)(Hendriks等人,2005,Cell Death Differ 12,637-48)。已显示APRIL在B细胞信号传导中发挥作用,并在体外驱动人和鼠B细胞的增殖和存活(综述于Kimberley等人,2009,J Cell Physiol.218(1):1-8中)。

[0006] APRIL主要由免疫细胞亚群表达,例如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞、B细胞和T细胞,其中许多也表达BAFF。另外,APRIL可由非免疫细胞如破骨细胞、上皮细胞和多种肿瘤组织表达(综述于Kimberley等人,2009,J Cell Physiol.218(1):1-8中)。事实上,APRIL最初是根据其在癌细胞中的表达来鉴定的(Hahne等人,1998,J Exp Med 188,1185-90)。在一组肿瘤细胞系以及人原发性肿瘤如结肠和淋巴癌中发现了APRIL mRNA的高表达水平。

[0007] 发现罹患IgA肾病的患者的APRIL血清水平升高(McCarthy等人,2011,J.Clin.Invest.121(10):3991-4002)。

[0008] APRIL在几种B细胞恶性肿瘤以及一些实体瘤的存活和增殖能力中发挥着至关重要的作用。APRIL也正在成为炎症性疾病或自身免疫的关键参与者。因此,拮抗APRIL的策略是这些疾病中的许多的治疗目标。事实上,目前正在进行用TACI-Fc(Atacicept)靶向APRIL以治疗几种自身免疫疾病的临床研究。然而,TACI-Fc还靶向BAFF,一种参与正常B细胞维持的因子。针对APRIL的抗体已在WO9614328、WO2001/60397、WO2002/94192、WO9912965、WO2001/196528、WO9900518和WO2010/100056中进行了描述。WO2010/100056描述了特异性靶向APRIL的抗体。WO2010/100056的抗体完全阻断APRIL与TACI的结合,且至少部分阻断与BCMA的结合。抗体hAPRIL.01A完全阻断与BCMA和TACI两者的结合。hAPRIL.01A抗体在体外和体内抑制B细胞增殖、存活和抗原特异性免疫球蛋白分泌(Guadagnoli等人,2011,Blood 117(25):6856-65)。另外,hAPRIL.01A在体外和体内抑制了代表人类CLL和MM疾病的恶性细

胞的增殖和存活(Guadagnoli等人,2011,Blood 117(25):6856-65;Lascano等人,2013,Blood 122(24):3960-3;Tai等人,2014,ASH poster 2098)。最后,hAPRIL.01A抑制抗原特异性IgA的分泌(Guadagnoli等人,2011,Blood 117(25):6856-65)。抗APRIL抗体,包括那些完全阻断与BCMA和TACI两者的结合的抗体可用于治疗IgA肾病,并且需要提供更有效的配制物和给药方案来治疗此疾病。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明涉及适合通过肠胃外途径,并且特别是静脉内和/或皮下途径递送的抗APRIL抗体配制物。本文所述的配制物可提供高浓度给药溶液,同时保持可接受的粘度、抗体溶解度、蛋白质降解和聚集水平(特别是在长期储存期间)以及由配制物的某些非活性成分引起的给药部位疼痛。

[0011] 在第一方面,本发明提供了一种抗体配制物,所述抗体配制物包含:

[0012] 浓度为约20mg/mL至约190mg/mL的抗APRIL抗体;

[0013] 约10mM L-组氨酸;

[0014] 约75mM L-精氨酸;

[0015] 约3%重量%山梨醇;

[0016] 约0.01重量%聚山梨醇酯20;以及

[0017] 约6.0至约6.6的pH。

[0018] 在各种实施方案中,配制物表现出以下特征中的一种或多种,并且优选地2、3或全部4种:

[0019] 粘度为16cP或更低,

[0020] 不包含谷氨酸或其盐,

[0021] 具有约250mOsm/kg至约390mOsm/k的重量摩尔渗透压浓度,以及

[0022] 在330nm处的光密度(OD330)为约1.0或更小。

[0023] 在某些实施方案中,在制造配制物后,所述配制物在2-8℃下储存9个月后保持抗APRIL抗体的至少96%纯度;并且还优选在制造配制物后,在25℃下储存6个月后保持抗APRIL抗体的至少95%纯度。

[0024] 通常认为蛋白质聚集是由两种不稳定因素引起的:构象和胶体。构象稳定性是蛋白质折叠与未折叠状态之间自由能的差异。虽然没有直接测量为能量值,但T_M的熔化温度值或在另一个程度上,聚集温度T_{Agg}可定性地确定配制物之间构象稳定性的增加或减少。胶体稳定性是平衡吸引和排斥的分子间相互作用的结果;也就是说,发生的蛋白质-蛋白质相互作用越少,样品聚集的可能性就越小。渗透相互作用第二维里系数可提供一种工具,用于预测配制物状态下蛋白质的聚集倾向。在某些实施方案中,当在25℃下测量时,本发明的配制物具有约2.5×10^{-5}mol·mL/g^2或更大的第二维里系数。第二维里系数可如本领域已知地测量,例如通过静态光散射或膜重量摩尔渗透压浓度法。

[0025] 高浓度抗体配制物通常被描述为“乳白色”,这是一种由样品浑浊所致的特性,并且可能是抗体自缔合和聚集的前兆。在330nm处测量的光密度反映了此浊度。在优选实施方案中,配制物具有约0.8或更小的OD330。

[0026] 在各种实施方案中,配制物的抗APRIL抗体具有约7.4或更大的计算等电点(pI)。使用Bjellqvist等人,Electrophoresis 1993,14,1023-1031中描述的氨基酸的pK值计算

蛋白质pI。

[0027] 在优选实施方案中,抗APRIL抗体在配制物中的浓度为约150mg/mL。在特别优选的实施方案中,此类配制物具有约290mOsm/kg至约390mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度,并且最优选地还具有约0.8或更小的OD330。

[0028] 在其它优选实施方案中,抗APRIL抗体在配制物中的浓度为约20mg/mL。在特别优选的实施方案中,此类配制物具有约293mOsm/kg至约333mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度,并且最优选地还具有约0.8或更小的OD330。

[0029] 在某些实施方案中,配制物不含甘氨酸、碳酸盐、HEPES、磷酸盐、柠檬酸盐和乙酸盐中的一种或多种,并且最优选不含其中的每一种。

[0030] 优选地,配制物的抗APRIL抗体是人源化抗体,所述人源化抗体包含选自由以下组成的组的重链可变区.轻链可变区对:VH11.VL15、VH12.VL15、VH13.VL15、VH14.VL15、VH14_1.VL15、VH14_1C.VL15、VH14_1D.VL15、VH14_1E.VL15和VH14_1G.VL15。这些序列在下文中定义。最优选的是VH14_1G.VL15。

[0031] 本文件通篇使用的术语“约”是指任何给定值的+/-10%,并且优选是任何给定值的+/-5%。

[0032] 在相关方面,本技术方案涉及向有需要的个体施用抗APRIL抗体的方法,所述方法包括通过皮下注射向个体施用本文所述的配制物。

[0033] 在另一相关方面,本技术方案涉及向有需要的个体施用抗APRIL抗体的方法,所述方法包括通过静脉内输注向个体施用本文所述的配制物。

[0034] 如下文所述,可采用各种给药时间表。在某些实施方案中,方法包括以每周(“QW”)时间表重复输注或皮下施用多个周期(例如,4周、6周、8周等)。在其它实施方案中,方法包括以至少每两周(“如本文所用的每两周一次”或“Q2W”)时间表的时间表重复输注或皮下施用多个周期(例如,4周、6周、8周等)。或者,方法包括以至少每4周(“Q4W”)或每月一次(“QMT”)时间表的时间表重复输注或皮下施用多个周期(例如,8周、12周、16周等)。在某些实施方案中,使用前负荷给药时间表。在一个实例中,负荷给药时间表包括通过静脉内输注或皮下施用进行施用,至少每两周重复一次达至至少4周,然后是维持给药时间表,其包括通过静脉内输注或皮下施用进行施用,其中与负荷给药时间表期间相比,维持给药时间表导致施用较少的抗APRIL抗体,或者通过每次施用包含较少的抗APRIL抗体,或者通过以更长的间隔施用。在另一实例中,负荷给药时间表包括通过静脉内输注或皮下施用进行施用,至少每天重复一次并且更优选每天重复两次达至至少4天,然后是维持给药时间表,其包括通过静脉内输注或皮下施用进行施用,例如按照QW、Q2W、Q4W、QM等时间表。在一个实施方案中,负荷给药时间表包括通过静脉内输注施用抗体,并且维持给药时间表包括通过皮下注射施用抗体。在另一实施方案中,负荷给药时间表和维持给药时间表都包括通过皮下注射施用抗体。在另一实施方案中,负荷给药时间表和维持给药时间表都包括通过静脉内输注施用抗体。这并不意味着是一个详尽的给药时间表列表。

[0035] 仅举例来说,所述方法的皮下注射包括将约2mL的抗体配制物施用至患者的优选注射部位(例如大腿、腹部、上臂等)。在优选实施方案中,配制物的抗APRIL抗体的浓度为约150mg/mL,使得在单次注射中施用约300mg的抗APRIL抗体。在某些实施方案中,所述方法的皮下注射包括施用约4mL(作为单次注射或作为2×2mL注射)浓度为约150mg/mL的抗APRIL

抗体的抗体配制物，导致施用约600mg抗APRIL抗体。可根据需要调节施用量和作为单次施用的一部分所需的注射次数，以实现约10mg至约1350mg抗APRIL抗体的总所需剂量。

[0036] 在某些其它实施方案中，方法的静脉内输注包括：(a)将本发明第一方面以及其实施方案的配制物稀释至0.9％盐水中约0.1mg/mL至约10mg/mL的浓度；和(b)在约2小时的时间段内，以单次静脉内剂量的稀释配制物向个体施用总剂量为约10mg至约1350mg的抗APRIL抗体。同样，仅举例来说，将约15mL抗APRIL抗体浓度为约20mg/mL的配制物添加至约235mL的0.9％盐水中，以提供浓度约为1.2mg/mL的静脉内剂量。

[0037] 在某些实施方案中，向有需要的个体施用抗APRIL抗体的方法包括通过负载/维持施用方案施用本文所述的配制物。此类方案可包括方案的负荷部分，其包括以比负荷/维持施用方案的维持部分中的抗APRIL抗体浓度更高的浓度一次或多次施用抗APRIL抗体；以比负荷/维持施用方案的维持部分中的抗APRIL抗体的施用频率更高的频率一次或多次施用抗APRIL抗体；和/或以与负荷/维持施用方案的维持部分中的抗APRIL抗体的施用途径不同的途径一次或多次施用抗APRIL抗体。

[0038] 仅举例来说，负荷/维持给药方案的负荷部分可包括一次或多次静脉内施用抗APRIL抗体，并且负荷/维持施用方案的维持部分包括一次或多次皮下施用抗APRIL抗体。在此类实例中，相比于维持施用中所使用的，负荷施用的浓度可更高和/或施用频率可更高。

[0039] 在另一实例中，负荷/维持给药方案的负荷部分可包括一次或多次皮下施用抗APRIL抗体，并且负荷/维持施用方案的维持部分包括一次或多次静脉内施用抗APRIL抗体。在此类实例中，相比于维持施用中所使用的，负荷施用的浓度可更高和/或施用频率可更高。

[0040] 在另一实例中，负荷/维持给药方案的负荷部分可包括一次或多次皮下施用抗APRIL抗体，并且负荷/维持施用方案的维持部分包括一次或多次皮下施用抗APRIL抗体。在此类实例中，相比于维持施用中所使用的，负荷施用的浓度可更高和/或施用频率可更高。

[0041] 在一个实施方案中，负荷剂量包括静脉内输注150至1350mg抗APRIL抗体，随后以第一时间间隔输注所述量至少一次，并且维持剂量包括施用i)以最后一次负荷剂量输注后的第一时间间隔施用的较低量的抗APRIL抗体，随后以较低量和相同时间间隔施用至少一次，持续至少12周，ii)以最后一次负荷剂量输注后的第二时间间隔施用的相同量的抗APRIL抗体，随后以相同量和第二时间间隔施用至少一次，持续至少12周，其中第二时间间隔比第一时间间隔长，或iii)以最后一次负荷剂量输注后的第二时间间隔施用的较低量的抗APRIL抗体，随后以第二时间间隔施用相同量至少一次，持续至少12周，其中维持给药可通过静脉内输注或通过皮下注射，优选皮下注射。在一个实施方案中，负荷剂量包括皮下注射150至1350mg抗APRIL抗体，随后以第一时间间隔皮下注射所述量至少一次，并且维持剂量包括施用i)以最后一次负荷剂量输注后的第一时间间隔施用的较低量的抗APRIL抗体，随后以较低量和相同时间间隔施用至少一次，持续至少12周，ii)以最后一次负荷剂量输注后的第二时间间隔施用的相同量的抗APRIL抗体，随后以相同量和第二时间间隔施用至少一次，持续至少12周，其中第二时间间隔比第一时间间隔长，或iii)以最后一次负荷剂量输注后的第二时间间隔施用的较低量的抗APRIL抗体，随后以第二时间间隔施用相同量至少一次，持续至少12周，其中维持给药可通过静脉内输注或通过皮下注射。

[0042] 在本发明的另一实施方案中，提供含有用于治疗上述病症的材料的制品。所述制

品包括容器、标签和包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器(预先填充或在施用时从容器填充)、自动注射器、注射笔等。容器可由多种材料,例如玻璃或塑料形成。容器装有对治疗病况有效的组合物并且可具有无菌进入口(例如,容器可为具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。制品中的至少一种活性剂是包含根据本发明的抗APRIL抗体组合物的容器。在某些实施方案中,容器上或容器随附的标签表明所述组合物用于治疗所选病况,例如IgA肾病。制品还可包含第二容器,所述第二容器包含药学上可接受的缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。它还可包括在商业和使用者看来所需的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。另外,制品可包括带有使用说明书的包装插页。本发明的配制物可以多种形式提供,例如包含抗体配制物的单次使用或多次使用小瓶或包含抗体配制物的预填充注射器、自动注射器或注射笔。此类容器中抗APRIL抗体的浓度可为约20mg/mL至约190mg/mL,并且最优选为约150mg/mL。此类容器中配制物的体积可为0.5mL至50mL;优选为1mL至10mL,并且最优选为1mL、2mL、3mL、4mL或5mL。

[0043] 序列简述

[0044] 序列表中呈现的序列涉及用于本文所述的配制物和方法的优选抗体的V_H和V_L域以及重链和轻链的氨基酸序列和编码DNA序列,包括本文所述的优选抗体的优选重链和轻链的氨基酸序列和编码DNA序列。另外,还呈现了本文所述抗体的重链和轻链的CDR的氨基酸序列。下表1将序列标识与它们各自的序列相关联。

[0045] 表1:序列表

[0046]

SEQ ID NO:	描述
1	抗 hAPRIL 重链 CDR1 (AA)
2	抗 hAPRIL 重链 CDR2 (AA)
3	抗 hAPRIL 重链 CDR3 (AA)
4	抗 hAPRIL 轻链 CDR1 (AA)
5	抗 hAPRIL 轻链 CDR2 (AA)
6	抗 hAPRIL 轻链 CDR3 (AA)
7	VH11 重链可变区 (DNA)
8	VH11 重链可变区 (AA)
9	VH12 重链可变区 (DNA)
10	VH12 重链可变区 (AA)
11	VH13 重链可变区 (DNA)
12	VH13 重链可变区 (AA)
13	VH14 重链可变区 (DNA)
14	VH14 重链可变区 (AA)
15	VH14_1 重链可变区 (DNA)
16	VH14_1 重链可变区 (AA)
17	VH14_1C 重链可变区 (DNA)
18	VH14_1C 重链可变区 (AA)
19	VH14_1D 重链可变区 (DNA)
20	VH14_1D 重链可变区 (AA)
21	VH14_1E 重链可变区 (DNA)
22	VH14_1E 重链可变区 (AA)
23	VH14_1G 重链可变区 (DNA)
24	VH14_1G 重链可变区 (AA)

[0047]

SEQ ID NO:	描述
25	VL15 轻链可变区 (DNA)
26	VL15 轻链可变区 (AA)
27	VH14_1G 重链 (DNA)
28	VH14_1G 重链 (AA)
29	VL15 轻链 (DNA)
30	VL15 轻链 (AA)
31	重链分泌前导序列 (DNA)
32	重链分泌前导序列 (AA)
33	轻链分泌前导序列 (DNA)
34	轻链分泌前导序列 (AA)

[0048] 附图简述

[0049] 图1描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在温度应力、冷冻/解冻和摇动应力后的浊度、视觉外观和pH的表格结果。

[0050] 图2描绘了通过SE-UPLC测量的各种VH14_1G.VL15抗体配制物在温度应力、冷冻/解冻和摇动应力后的百分比纯度的表格结果。

[0051] 图3描绘了通过在-70℃下储存12周后各种VH14_1G.VL15抗体配制物的峰面积测量SE-UPLC百分比纯度的图形表示。

[0052] 图4描绘了通过在2至8℃下储存12周后各种VH14_1G.VL15抗体配制物的峰面积测量SE-UPLC百分比纯度的图形表示。

[0053] 图5描绘了通过在25℃下储存12周后各种VH14_1G.VL15抗体配制物的峰面积测量SE-UPLC百分比纯度的图形表示。

[0054] 图6描绘了通过在45℃下储存12周后各种VH14_1G.VL15抗体配制物的峰面积测量SE-UPLC百分比纯度的图形表示。

[0055] 图7描绘了通过CEX-UPLC测量的各种VH14_1G.VL15抗体配制物在温度应力、冷冻/解冻和摇动应力后的百分比纯度的表格结果。

[0056] 图8描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在25℃下的ln纯度(%)相对于时间(天)。

[0057] 图9描绘了四种VH14_1G.VL15抗体配制物在2-8℃、25℃和45℃下的阿伦尼乌斯关系图(ln k_{obs}相对于1/T(开尔文))。

[0058] 图10描绘了四种VH14_1G.VL15抗体配制物在25℃下的ln纯度(%)相对于时间(天)。

[0059] 图11描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在25℃和45℃下的阿伦尼乌斯关系图(ln k_{obs}相对于1/T(开尔文))。

[0060] 图12描绘了各种VH14_1G.VL15抗体测试样品中的物种群体的流体动力学半径(以nm为单位)和质量百分比。

[0061] 图13描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在温度应力后的浊度、视觉外观和pH的表格结果。

[0062] 图14描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在温度应力后的HIAC粒子计数表格结果。

[0063] 图15描绘了通过SE-HPLC测量的各种VH14_1G.VL15抗体配制物在温度应力后的百分比纯度的表格结果。

[0064] 图16描绘了通过CE-HPLC测量的各种VH14_1G.VL15抗体配制物在温度应力后的百分比纯度的表格结果。

[0065] 图17描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在25℃下的ln纯度(%)相对于时间(天)。

[0066] 图18描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在45℃下的ln纯度(%)相对于时间(天)。

[0067] 图19描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在25℃和45℃下的阿伦尼乌斯关系图(ln k_{obs}相对于1/T(开尔文))。

[0068] 图20描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在5℃下的ln纯度(%)相对于时间(天)。

[0069] 图21描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在25℃下的ln纯度(%)相对于时间

(天)。

[0070] 图22描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在45℃下的ln纯度(%)相对于时间(天)。

[0071] 图23描绘了各种VH14_1G.VL15抗体配制物在5℃、25℃和45℃下的阿伦尼乌斯关系图(ln k_{obs}相对于1/T(开尔文))。

[0072] 图24描绘了评估IV施用的VH14_1G.VL15的安全性、耐受性、PK和PD的临床试验方案。

[0073] 图25描绘了在IV施用不同剂量的BION-1301之后的平均血清BION-1301浓度+/-SD相对于标称时间。

[0074] 图26描绘了在IV施用各种剂量的BION-1301之后,呈初始基线浓度的百分比形式的血清中的平均游离APRIL浓度。

[0075] 图27A-F描绘了在IV施用各种剂量的BION-1301之后,呈初始基线浓度的百分比形式的血清中的血清免疫球蛋白IgA、IgG和IgM浓度的平均变化。

[0076] 图28A描绘了在IV施用各种剂量的BION-1301之后第29天,呈初始基线浓度的百分比形式的血清中的血清免疫球蛋白IgA、IgG和IgM浓度的百分比变化。

[0077] 图28B描绘了在IV施用各种剂量的BION-1301之后第85天,呈初始基线浓度的百分比形式的血清中的血清免疫球蛋白IgA、IgG和IgM浓度的百分比变化。

[0078] 图29描绘了评估IV施用相对于SC施用的BION-1301的安全性、耐受性、PK和PD的临床试验方案。

[0079] 图30描绘了在单次IV或SC施用300mg BION-1301之后BION-1301的平均(±SD)血清浓度相对于时间(半对数标度)。

[0080] 图31A描绘了在单剂量IV或SC施用300mg BION-1301之后的平均(±SD)fAPRIL浓度。

[0081] 图31B描绘了单剂量IV或SC施用300mg BION-1301之后相对于fAPRIL基线的平均(±SD)百分比变化。

[0082] 图32A-C描绘了在单剂量IV或SC施用300mg BION-1301之后血清免疫球蛋白水平随时间的平均百分比变化(32A＝IgA,32B＝IgG,32C＝IgM)。

[0083] 图33显示在健康人类志愿者中通过静脉内(IV)输注施用BION-1301的单次递增剂量(SAD)和多次递增剂量(MAD)研究(ADU-CL-19;ClinicalTrials.gov标识符:NCT03945318)中,血清IgA和Gd-IgA1的减少。

[0084] 图34显示了IgAN患者在用BION-1301治疗之后游离APRIL水平、Gd-IgA1水平、系膜细胞增殖和蛋白尿的变化。

具体实施方式

[0085] 因此,本发明涉及可有效治疗IgA肾病的如本文所述的抗体、其用途和配制物。本文所述的抗体使用具有氨基酸序列SEQ ID NO:28的重链和SEQ ID NO:30的轻链的抗hAPRIL抗体(也称为VH14_1G.VL15,或如在临床试验中所使用也称为BION-1301)举例说明。此抗体阻断人APRIL与人B细胞成熟抗原(BCMA)和跨膜活化剂和钙调节剂以及亲环蛋白配体相互作用物(TACI)的结合,并已被证明可显著降低健康志愿者的IgA水平。预期IgA水平

的这种降低在患有IgA肾病的受试者中是相似的，且因此预期具有显著的治疗益处。可在本文所述的配制物和方法中使用的抗体的其它特征和论述可在国际专利申请第WO2016110587号中找到，所述申请的公开内容以引用方式并入本文，因为其涉及可用于治疗IgA肾病的抗APRIL抗体。预期本文提供的配制物和方法提供用于治疗IgA肾病的抗hAPRIL抗体的稳定配制物。

[0086] 在本发明的描述中，至少90％的序列相似性应被理解为意味着更优选至少95％、例如至少99％的序列相似性。

[0087] 如本领域技术人员将理解的，“序列相似性”是指单个核苷酸或肽序列相似的程度。两个序列之间的相似性程度取决于同一性程度以及保守变化的程度。“序列相似性”的百分比是相同或保守变化的氨基酸或核苷酸的百分比，即“序列相似性”＝(序列同一性％)+(保守变化％)。

[0088] 为了本发明的目的，“保守变化”和“同一性”被认为是广义术语“相似性”的种类。因此，无论何时使用术语序列“相似性”，它都包含序列“同一性”和“保守变化”。根据某些实施方案，保守变化被忽略并且序列相似性％是指序列同一性％。

[0089] 术语“序列同一性”是技术人员已知的。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列共有的序列同一性程度，出于最佳比较目的而比对序列(例如，可在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入空位以便与第二氨基酸或核酸序列进行最佳比对)。这种比对可在被比较的序列的全长上进行。或者，可在较短比较长度上，例如在约20、约50、约100或更多个核酸/碱基或氨基酸上进行比对。

[0090] 接着比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则分子在所述位置是相同的。序列之间共享的同一性程度典型地以两个序列之间的同一性百分比表示，并且是序列中相同残基共享的相同位置数量的函数(即，同一性百分比＝相应位置的相同残基数/位置总数×100)。优选地，被比较的两个序列具有相同或基本相同的长度。

[0091] “保守变化”的百分比可类似于序列同一性的百分比来确定。然而，在此情况下，可能保留原始残基功能特性的氨基酸或核苷酸序列的特定位置的变化被评分为好像没有发生变化。

[0092] 对于氨基酸序列，相关功能特性是氨基酸的物理化学特性。本发明多肽中氨基酸的保守取代可选自所述氨基酸所属类别的其它成员。例如，在蛋白质生物化学领域中众所周知的是，属于具有特定大小或特征(例如电荷、疏水性和亲水性)的氨基酸组的氨基酸可被另一种氨基酸取代而不会显著改变蛋白质的活性，特别是在与生物活性不直接相关的蛋白质区域中(参见例如Watson等人，Molecular Biology of the Gene，The Benjamin/Cummings Pub.Co.，第224页(第4版1987))。例如，非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。保守取代包括例如用Lys取代Arg，且反之亦然，以保持正电荷；用Glu取代Asp，且反之亦然，以保持负电荷；用Ser取代Thr，且反之亦然，以保持游离的-OH；以及用Gln取代Asn，且反之亦然，以保持游离的$-NH_2$。

[0093] 对于核苷酸序列，相关的功能特性主要是某个核苷酸在序列的开放阅读框中携带

的与转录和/或翻译机制相关的生物学信息。众所周知，遗传密码具有简并性(或冗余性)，并且多个密码子可能携带与其编码的氨基酸有关的相同信息。例如，在某些物种中，氨基酸亮氨酸由UUA、UUG、CUU、CUC、CUA、CUG密码子编码(或对于DNA为TTA、TTG、CTT、CTC、CTA、CTG)，而氨基酸丝氨酸由UCA、UCG、UCC、UCU、AGU、AGC指定(或对于DNA为TCA、TCG、TCC、TCT、AGT、AGC)。不改变翻译信息的核苷酸变化被视为保守变化。

[0094] 对于本发明，最优选使用BLAST(基本局部比对工具)来确定核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性和/或相似性。

[0095] 使用Altschul等人(1990)的BLASTn、BLASTp、BLASTx、tBLASTn和tBLASTx程序进行查询可通过BLAST的在线版本发布，所述版本可通过http://www.ncbi.nlm.nih.gov访问。或者，可使用也可通过NCBI互联网站点下载的独立版本的BLAST(例如，版本2.2.29(2014年1月3日发布))。优选地，使用以下参数执行BLAST查询。为了确定氨基酸序列之间的百分比同一性和/或相似性：算法：blastp；字长：3；评分矩阵：BLOSUM62；空位成本：存在：11，扩展：1；成分调整：条件性成分得分矩阵调整；过滤器：关闭；掩码：关闭。为了确定核苷酸序列之间的百分比同一性和/或相似性：算法：blastn；字长：11；查询范围内的最大匹配数：0；匹配/不匹配分数：2，-3；空位成本：存在：5，扩展：2；过滤器：低复杂度区域；掩码：仅用于查找表的掩码。

[0096] 借助指定的算法和计算机程序，可类似于序列同一性的百分比来确定“保守变化”的百分比。一些计算机程序，例如BLASTp呈现阳性的数量/百分比(＝相似性)和同一性的数量/百分比。保守变化的百分比可通过从阳性/相似性百分比中减去同一性百分比来得出(保守变化百分比＝相似性百分比-同一性百分比)。

[0097] 根据另一方面，本发明涉及编码根据本发明的抗体的V_H域和/或V_L域，或抗体的重链和/或轻链的分离的多核苷酸。编码V_H域的多核苷酸序列优选是与选自由以下组成的组的多核苷酸序列具有至少90％序列相似性的多核苷酸序列：SEQ ID NO:7、9、11、13、15、17、19、21和23，优选SEQ ID NO:13、15或23，更优选SEQ ID NO:23。编码V_L域的多核苷酸序列优选是与SEQ ID NO:25的多核苷酸序列具有至少90％序列相似性的多核苷酸序列。编码重链的多核苷酸序列优选是与SEQ ID NO:27的多核苷酸序列具有至少90％序列相似性的多核苷酸序列。编码轻链的多核苷酸序列优选是与SEQ ID NO:29的多核苷酸序列具有至少90％序列相似性的多核苷酸序列。

[0098] 本发明进一步涉及包含多个表达载体的表达单元，其包含在合适的调节序列控制下的根据本发明的多个多核苷酸，其中所述多个多核苷酸编码根据本发明的抗体的V_H域或重链和V_L域或轻链。可设计表达单元，使得编码V_H域或重链的多核苷酸序列和编码V_L域或轻链的多核苷酸序列可在相同的表达载体上。因此，表达单元可包含单个载体。或者，编码V_H域或重链的多核苷酸序列和编码V_L域或轻链的多核苷酸序列可在不同的表达载体上。在此类实施方案中，表达单元将包含多个，例如2个表达载体。

[0099] 本发明的另一方面涉及包含许多本发明的多核苷酸和/或本发明的表达单元的宿主细胞。表达单元优选是包含表达载体的表达单元，所述表达载体包含编码V_H域或重链的多核苷酸序列和编码V_L域或轻链的多核苷酸序列。

[0100] 疗法

[0101] 本发明抗体的配制物和使用方法适用于治疗已知或预期通过阻断人APRIL与BCMA

和/或TACI的相互作用而改善的病况。如本领域已知的，阻断人APRIL与BCMA和/或TACI的相互作用抑制免疫细胞增殖和/或存活，并因此对于治疗这种阻断免疫细胞增殖和/或存活有益的病况，例如炎症性疾病、由Ig分泌介导的疾病和/或自身免疫性疾病可能是有价值的。阻断人APRIL与BCMA和/或TACI的相互作用也可能有益于癌症的治疗。

[0102] 此外，本发明的抗体可有益于治疗其它病况，其中降低免疫球蛋白水平，例如IgA，包括IgA1或IgA2、IgG、IgM、Gd-IgA的水平是有益的，例如与以下各者相关的病况：Ig分泌，特别是IgA分泌，Ig过度产生，例如IgA，包括IgA1或IgA2、IgG、IgM、Gd-IgA过度产生，特别是IgA过度产生，或Ig沉积，特别是IgA沉积。此类病况的实例包括但不限于IgA肾病和其它形式的肾小球肾炎、乳糜泻、类天疱疮疾病、亨-舍二氏紫癜(Henloch-Schönleinpurpura)和其它与Ig沉积相关的自身免疫性疾病。如本文所述的抗hAPRIL抗体的配制物和使用方法特别适用于治疗IgA肾病。

[0103] IgA肾病(IgAN)是原发性肾小球肾炎的主要原因(Berthelot L等人,2015,Kidney Int,88:815-22)。IgAN患者的预后是可变的，并且取决于若干因素。对于活检时具有轻度或中度蛋白尿水平且肾功能正常的患者，2.8％的患者在25年的随访中发展为终末期肾病(ESRD)(Knoop T等人,2017,Nephrol Dial Transplant 32:1841-50)，导致透析或肾移植。对于一般IgAN群体，据报道14％至39％在诊断后20年内发展为ESRD(Berthoux FC等人,2008,Semin Nephrol 28:4-9;Manno C等人,2007,Am J Kidney Dis,49:763-75)。IgAN病理学的一个关键早期步骤是产生针对半乳糖缺陷型IgA1(gd-IgA1)的自身抗体，从而导致免疫复合物的形成，其引起导致肾脏损伤的炎症、系膜细胞增殖和补体活化。APRIL与BCMA和TACI结合以驱动人浆母细胞/浆细胞的增殖和存活(O'Connor BP等人,2004,J Exp Med,199:91-8;Moreaux J等人,2007,Haematologica,92:803-11)。APRIL通过促进B细胞类转换为产生IgA的浆细胞来促进IgAN(He B等人,2010,Nat Immunol 11:836-45)。重要的是，抗APRIL抗体减少IgAN鼠类模型中的肾脏损伤、血清IgA、IgA沉积和蛋白尿。

[0104] 据报道，IgAN患者的血清Gd-IgA1水平显著高于疾病对照和健康对照。在IgAN患者中，血清Gd-IA1水平与估计的肾小球滤过率、血清IgA水平和肾小管萎缩/间质纤维化显著相关。血清Gd-IgA1水平较高的IgAN患者的CKD进展比血清Gd-IgA1水平较低的患者更频繁。Cox比例风险模型显示，在调整了若干混杂因素后，高GdIgA1水平是CKD进展的独立危险因素。Kim等人,J.Clin.Med.2020 Nov 4;9(11):3549.doi:10.3390/jcm9113549。

[0105] 一种人源化APRIL拮抗性单克隆抗体(如本文所述)正在开发中，其用于治疗IgAN，已在健康志愿者中进行了临床试验(参见clinicaltrials.gov NCT03945318)。已显示抗hAPRIL抗体阻断APRIL可显著降低健康食蟹猴中的IgA和IgM以及较小程度的IgG，并在健康人类志愿者中显示出类似的结果。另外，此阻断降低了健康人类志愿者的Gd-IgA1。因此，预期在IgAN患者中阻断APRIL将导致IgA、IgG和IgM水平降低，并相应降低gd-IgA1、gd-IgA1自身抗体、免疫复合物沉积和肾损伤。

[0106] Myette等人(2019,Kidney International 96(1):104-116)证明了小鼠抗APRIL抗体在IgA肾病小鼠模型中的功效，并且人类抗体VIS649是2期临床试验的一部分(clinicaltrials.gov NCT04287985)。

[0107] 一般定义

[0108] 术语“抗体”是指表现出所需生物活性的任何形式的抗体，例如抑制配体与其受体

的结合，或通过抑制配体诱导的受体信号传导。在本例中，生物活性包括阻断APRIL与其受体BCMA和/或TACI的结合。因此，“抗体”以最广义使用，并且具体涵盖但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)和多特异性抗体(例如双特异性抗体)，例如基于Duobody®技术(Genmab)或Hexabody®技术(Genmab)，或抗体片段。

[0109] “抗体片段”和“抗体结合片段”意指抗体的抗原结合片段和类似物，典型地包括亲本抗体的抗原结合或可变区(例如一个或多个CDR)的至少一部分。抗体片段至少保留了亲本抗体的一些结合特异性。典型地，当亲本结合活性以摩尔为基础表达时，抗体片段保留至少10％的亲本结合活性。优选地，抗体片段保留至少20％、50％、70％、80％、90％、95％或100％或更多的亲本抗体对靶标的结合亲和力。抗体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sc-Fv、单体(来自Genmab的技术)；纳米抗体(来自Ablynx的技术)；域抗体(来自Domantis的技术)；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。工程化抗体变体综述于Holliger和Hudson,2005,Nat.Biotechnol.23:1126-1136中。

[0110] “Fab片段”由一条轻链和一条重链的CH1和可变区构成。Fab分子的重链不能与另一重链分子形成二硫键。

[0111] “Fc”区含有两个重链片段，其包含抗体的C_H1和C_H2域。两条重链片段通过两个或更多个二硫键和C_H3域的疏水相互作用结合在一起。

[0112] “Fab’片段”含有一条轻链和一条重链的一部分，所述重链含有V_H域和C_H1域以及C_H1与C_H2域之间的区域，从而可在两个Fab’片段的两条重链之间形成链间二硫键，以形成F(ab’)$_2$分子。

[0113] “F(ab’)$_2$片段”含有两条轻链和两条重链，所述重链含有C_H1与C_H2结之间的恒定区的一部分，从而在两条重链之间形成链间二硫键。F(ab’)$_2$片段因此由两个Fab’片段构成，所述两个片段通过两条重链之间的二硫键结合在一起。

[0114] “Fv区”包含来自重链和轻链两者的可变区，但缺少恒定区。

[0115] “单链Fv抗体”(或“scFv抗体”)是指包含抗体的V_H和V_L域的抗体片段，其中这些域存在于单个多肽链中。通常，Fv多肽在V_H与V_L域之间进一步包含多肽接头，其使scFv能够形成抗原结合所需的结构。关于scFv的综述，参见Pluckthun,1994,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编Springer-Verlag,New York,第269-315页。另参见国际专利申请公开第WO 88/01649号和美国专利第4,946,778号和第5,260,203号。

[0116] “双抗体”是具有两个抗原结合位点的小抗体片段。所述片段包含一个重链可变域(V_H)，所述重链可变域与同一多肽链中的一个轻链可变域(V_L)相连(V_H-V_L或V_L-V_H)。通过使用太短而无法在同一链上的两个域之间配对的接头，所述域被迫与另一条链的互补域配对并产生两个抗原结合位点。双抗体更充分描述于例如EP 404,097；WO 93/11161；和Holliger等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448中。

[0117] “Duobody”是具有正常IgG结构的双特异性抗体(Labrijn等人,2013,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 110(13):5145-5150)。

[0118] “Hexabody”是在保留规则结构和特异性的同时具有增强的杀伤能力的抗体

(Diebolder等人,2014,Science 343(6176):1260-3)。

[0119] “域抗体片段”是仅含有重链可变区或轻链可变区的免疫功能免疫球蛋白片段。在一些情况下,两个或更多个V_H区与肽接头共价连接以产生二价域抗体片段。二价域抗体片段的两个V_H区可靶向相同或不同的抗原。

[0120] 本发明的抗体片段可包含足够的恒定区部分以允许具有降低的二硫键连接能力的重链二聚化(或多聚化),例如其中至少一个通常参与重链间二硫键连接的铰链半胱氨酸如本文所述地改变。在另一实施方案中,抗体片段,例如包含Fc区的抗体片段当存在于完整抗体中时保留至少一种通常与Fc区相关的生物学功能,例如FcRn结合、抗体半衰期调节、ADCC(抗体依赖性细胞毒性)功能和/或补体结合(例如,其中抗体具有ADCC功能或补体结合所必需的糖基化特征)。

[0121] 术语“嵌合”抗体是指重链和/或轻链的一部分与源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源于其它物种或属于其它抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源的抗体,以及此类抗体的片段,只要其表现出所需的生物学活性即可(参见例如美国专利第4,816,567号和Morrison等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855)。

[0122] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指含有来自非人(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,所述人源化抗体将包含至少一个且典型地两个可变域的基本全部,其中全部或基本全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些高变环且全部或基本全部的FR区为人免疫球蛋白序列的那些FR区。所述人源化抗体任选还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分。啮齿动物抗体的人源化形式将基本上包含与亲本啮齿动物抗体相同的CDR序列,尽管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它原因。

[0123] 本发明的抗体还包括具有修饰的(或阻断的)Fc区以提供改变的效应功能的抗体。参见,例如美国专利第5,624,821号;WO2003/086310;WO2005/120571;WO2006/0057702;Presta,2006,Adv.Drug Delivery Rev.58:640-656。此类修饰可用于增强或抑制免疫系统的各种反应,可能对诊断和治疗产生有益的影响。Fc区的改变包括氨基酸变化(取代、缺失和插入)、糖基化或去糖基化以及添加多个Fc。Fc的变化也可改变治疗性抗体中抗体的半衰期,并且更长的半衰期会导致给药频率降低,同时增加便利性并减少材料的用量。参见Presta,2005,J.Allergy Clin.Immunol.116:731,734-35。

[0124] 本发明的抗体还包括具有提供完整效应功能的完整Fc区的抗体,例如IgG1同种型抗体,其在靶细胞中诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0125] 抗体还可结合(例如共价连接)至提高抗体在储存期间的稳定性或增加抗体体内半衰期的分子。增加半衰期的分子的实例是白蛋白(例如人血清白蛋白)和聚乙二醇(PEG)。可使用本领域熟知的技术制备抗体的白蛋白连接和聚乙二醇化衍生物。参见例如Chapman,2002,Adv.Drug Deliv.Rev.54:531-545;Anderson和Tomasi,1988,J.Immunol.Methods 109:37-42;Suzuki等人,1984,Biochim.Biophys.Acta 788:248-255;以及Brekke和Sandlie,2003,Nature Rev.2:52-62。

[0126] 如本文中所用的术语"高变区"是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区包

含来自通过序列比对定义的“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基，例如在轻链可变域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)(参见Kabat等人,1991,Sequences of proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)，和/或来自“高变环”(HVL)的那些残基，如结构上所定义，例如轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)(参见Chothia和Leskl,1987,J.Mol.Biol.196:901-917)。

[0127] “框架”或“FR”残基或序列是那些不同于本文定义的CDR残基的可变域残基或序列。

[0128] 根据某些实施方案的本发明的抗体可为分离的抗体。“分离的”抗体是已被鉴定并从其自然环境的组分中分离和/或回收的抗体。其自然环境的污染成分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的材料，且可包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施方案中，抗体将被纯化至(1)按劳里法(Lowry method)测定的大于95重量%、并且最优选大于99重量%的抗体，(2)足以通过使用旋转杯测序仪获得至少15个N末端或内部氨基酸序列残基的程度，或(3)通过SDS-PAGE在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选银染达到均质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体，因为抗体自然环境中的至少一种组分将不存在。然而，通常，分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0129] “分离的”核酸分子是被鉴定并从抗体核酸的天然来源中通常与之相关的至少一种污染核酸分子中分离的核酸分子。分离的核酸分子与其在自然界中发现的形式或环境不同。因此，分离的核酸分子不同于天然细胞存在中的核酸分子。然而，分离的核酸分子包括包含在通常表达抗体的细胞中的核酸分子，其中例如，所述核酸分子位于与天然细胞不同的染色体位置。

[0130] 在用于本文时，术语“单克隆抗体”是指从基本上同质抗体的群体获得的抗体，即，包含所述群体的各个抗体是相同的，除了可以微量存在的可能的天然存在的突变。单克隆抗体具有高度特异性(针对单一抗原位点)。另外，与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体配制物相反，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”指示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特性并且不应解释为需要通过任何特定方法产生所述抗体。例如，根据本发明使用的单克隆抗体可通过由Kohler等人,1975,Nature 256:495首次描述的杂交瘤方法制备，或者可通过重组DNA方法(参见例如美国专利第4,816,567号)制备。“单克隆抗体”也可使用例如Clackson等人,1991,Nature 352:624-628和Marks等人,1991,J.Mol.Biol.222:581-597中描述的技术由噬菌体抗体文库分离。本文中的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体。

[0131] 如本文所用，术语“免疫细胞”包括具有造血来源并且在免疫反应中发挥作用的细胞。免疫细胞包括淋巴细胞例如B细胞和T细胞、自然杀伤细胞、骨髓细胞例如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0132] 如本文所用，“免疫结合物”是指与治疗部分，例如细菌毒素、细胞毒性药物或放射性毒素结合的抗人APRIL抗体或其片段。有毒部分可使用本领域可用的方法与本发明的抗体结合。

[0133] 如本文所用，序列“变体”或“变体序列”是指在一个或多个氨基酸残基处不同于所

公开的序列但保留亲本分子的生物活性的序列。本发明包括由各种序列明确公开的抗体变体。对于VH域CDR1、CDR2和CDR3序列，根据一些实施方案，对于合在一起的CDR1、CDR2和CDR3序列，变体序列可包含至多6个氨基酸取代，例如1、2、3、4、5或6个氨基酸取代。类似地，对于VL域CDR1、CDR2和CDR3序列，根据一些实施方案，对于合在一起的CDR1、CDR2和CDR3序列，变体序列可包含至多6个氨基酸取代，例如1、2、3、4、5或6个氨基酸取代。

[0134] “保守修饰的变体”或“保守氨基酸取代”是指本领域技术人员已知的氨基酸取代，并且通常可在不改变所得分子的生物活性的情况下进行。本领域技术人员认识到，一般而言，多肽非必需区域中的单个氨基酸取代不会显著改变生物活性(参见例如Watson等人，Molecular Biology of the Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224页(第4版1987))。

[0135] 如本文所用，术语“约”是指如本领域普通技术人员所确定的在特定值的可接受误差范围内的值，这将部分取决于如何测量或确定所述值，即测量系统的局限性。例如，“约”可表示按照本领域实践在1个或超过1个标准偏差内。或者，“约”或“基本上包含”可意指至多20％的范围。此外，特别是关于生物系统或过程，所述术语可能意味着至多一个数量级或至多5倍的值。当在申请和权利要求中提供特定值时，除非另有说明，否则“约”或“基本上包含”的含义应假定在所述特定值的可接受误差范围内。

[0136] 术语“数个”应理解为意指一个或多个。根据其使用的上下文，“数个”可指选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10的任何合适的数字。根据某些实施方案，“数个”可具有“多个”的含义。根据其使用的上下文，“多个”可指选自2、3、4、5、6、7、8、9、10的任何合适的数字。

[0137] 当提及配体/受体、抗体/抗原或其它结合对时，“特异性”结合表示在蛋白质和/或其它生物制品的异质群体中确定蛋白质(例如APRIL)的存在的结合反应。因此，在指定的条件下，规定的配体/抗原与特定的受体/抗体结合，并且不会与样品中存在的其它蛋白质大量结合。

[0138] “施用”、“疗法”和“治疗”当适用于动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物体液时，是指使外源性医药剂、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物体液接触。“施用”、“疗法”和“治疗”可指例如治疗、药物动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与体液的接触，其中体液与细胞接触。“施用”、“疗法”和“治疗”还指体外和离体治疗，例如，通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞对细胞进行的治疗。在本发明的本说明书中，术语“体外”和“离体”具有相似的含义并且可互换使用。在本发明中，“病况”的治疗包括任何治疗用途，包括抗人APRIL抗体的预防和治疗用途。因此，术语“病况”可指疾病状态，但也可指预防环境中的生理状态，其中生理学不会改变为有害状态。

[0139] 抗体DNA也可被修饰，例如，通过用人重链和轻链恒定域的编码序列代替同源鼠序列(美国专利第4,816,567号;Morrison等人,1984,Proc.Natl Acad.Sci.USA,81:6851)，或通过将非免疫球蛋白材料(例如蛋白质域)的全部或部分编码序列共价连接至免疫球蛋白编码序列。典型地，此类非免疫球蛋白材料取代抗体的恒定域，或取代抗体的一个抗原结合位点的可变域，以产生包含一个对抗原具有特异性的抗原结合位点和另一个对不同抗原具有特异性的抗原结合位点的嵌合二价抗体。

[0140] 本发明的抗人APRIL抗体的氨基酸序列变体通过将适当的核苷酸改变引入编码

DNA或通过肽合成来制备。此类变体包括例如抗APRIL抗体所示的氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体，前体条件是最终构建体具有所需的特征。氨基酸变化也可改变抗APRIL抗体的翻译后过程，例如改变糖基化位点的数量或位置。

[0141] 一种鉴定作为诱变优选位置的抗APRIL抗体多肽的某些残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”，如Cunningham和Wells,1989,Science 244:1081-1085中所述。此处，一个残基或一组目标残基被鉴定(例如带电残基，如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并被中性或带负电氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)取代，以影响氨基酸与APRIL抗原的相互作用。接着通过在取代位点处或针对取代位点引入进一步或其它的变体来精制对取代表现出功能敏感性的氨基酸残基。因此，虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先确定的，但突变本身的性质不需要预先确定。例如，为了分析给定位点的突变性能，在目标密码子或区域进行Ala扫描或随机诱变，并针对所需活性筛选表达的抗APRIL抗体的变体。

[0142] 通常，抗APRIL抗体的氨基酸序列变体将具有与重链或轻链的原始抗体氨基酸序列具有至少75％、更优选至少80％、更优选至少85％、更优选至少90％并且最优选至少95％、98％或99％氨基酸序列相似性的氨基酸序列。关于此序列的相似性或同源性如上文所定义。

[0143] 可针对增加的体外生物活性或合适的结合亲和力筛选具有本文鉴定为所需特征的抗体。为了筛选结合至人APRIL上与hAPRIL.01A相同的表位的抗体，可进行常规交叉阻断分析，例如Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow和David Lane(1988)中所述的分析。与相同表位结合的抗体可能在此类分析中交叉阻断，但并非所有交叉阻断抗体都必然会在完全相同的表位处结合，因为交叉阻断可能是由于抗体在重叠表位，或甚至附近的非重叠表位处结合而导致抗体结合的空间位阻。

[0144] 或者，可进行例如如Champe等人,1995,J.Biol.Chem.270:1388-1394中所述的表位作图，以确定抗体是否结合感兴趣的表位。如由Cunningham和Wells,1989,Science 244:1081-1085所述的“丙氨酸扫描诱变”，或人APRIL中氨基酸残基的一些其它形式的点诱变也可用于确定本发明的抗APRIL抗体的功能表位。

[0145] 抗体表位作图的另一种方法是研究抗体与合成线性和CLIPS肽的结合，所述肽可使用如Slootstra等人(Slootstra等人,1996,Mol.Diversity 1:87-96)和Timmerman等人(Timmerman等人.,2007,J.Mol.Recognit.20:283-299)所述的信用卡格式迷你PEPSCAN卡进行筛选。在基于PEPSCAN的酶联免疫分析(ELISA)中确定抗体与每种肽的结合。

[0146] 与hAPRIL.01A结合至相同表位的其它抗体可例如通过关于与表位的结合筛选针对APRIL产生的的抗体，或通过用含有包含表位序列的人APRIL片段的肽使动物免疫来获得。结合至相同功能表位的抗体预期可能会表现出相似的生物学活性，例如相似的APRIL结合以及BCMA和TACI阻断活性，并且此类活性可通过抗体的功能分析来确认。

[0147] 抗体可选自任何种类的免疫球蛋白，包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE。优选地，抗体是IgG抗体。可使用任何IgG同种型，包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。也考虑了IgG同种型的变体。抗体可包含来自多于一个类别或同种型的序列。通过使用本领域已知的或如本文所述的生物分析筛选抗体，很容易实现对产生所需生物活性所需的恒定域序列的优化。

[0148] 同样，任一类轻链均可用于本文的组合物和方法。具体而言，κ、λ或其变体可用于

本发明的组合物和方法。

[0149] 本发明的抗体和抗体片段还可与细胞毒性有效负载，例如细胞毒性剂或放射性核苷酸，例如^{99}Tc、^{90}Y、^{111}In、^{32}P、^{14}C、^{125}I、^{3}H、^{131}I、^{11}C、^{15}O、^{13}N、^{18}F、^{35}S、^{51}Cr、^{57}To、^{226}Ra、^{60}Co、^{59}Fe、^{57}Se、^{152}Eu、^{67}Cu、^{217}Ci、^{211}At、^{212}Pb、^{47}Sc、^{109}Pd、^{234}Th和^{40}K、^{157}Gd、^{55}Mn、^{52}Tr和^{56}Fe结合。此类抗体结合物可用于免疫疗法以选择性地靶向并杀死在其表面上表达靶标(所述抗体的抗原)的细胞。示例性细胞毒剂包括蓖麻毒素、长春花生物碱、甲氨蝶呤、假单胞菌外毒素、皂草素、白喉毒素、顺铂、阿霉素、相思豆毒素、白树毒素和商陆抗病毒蛋白。

[0150] 本发明的抗体和抗体片段也可与荧光或化学发光标记结合，包括荧光团，例如稀土螯合物、荧光素和其衍生物、罗丹明和其衍生物、异硫氰酸酯、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛、荧光胺、^{152}Eu、丹酰、伞形酮、萤光素、鲁米诺(luminal)标记、异鲁米诺标记、芳香族吖啶酯标记、咪唑标记、吖啶盐标记、草酸酯标记、水母发光蛋白标记、2,3-二氢酞嗪二酮、生物素/抗生物素蛋白、自旋标记和稳定自由基。

[0151] 可采用本领域已知的用于将本发明的抗体分子或蛋白质分子与各种部分结合的任何方法，包括如下所述的那些方法:Hunter等人,1962,Nature 144:945;David等人,1974,Biochemistry 13:1014;Pain等人,1981,J.Immunol.Meth.40:219;和Nygren,J.,1982,Histochem.and Cytochem.30:407。用于结合抗体和蛋白质的方法是本领域常规且众所周知的。

[0152] 抗体纯化

[0153] 当使用重组技术时，抗体可在细胞内、周质空间中产生或直接分泌至培养基中。如果抗体在细胞内产生，则作为第一步，例如通过离心或超滤去除微粒碎片，无论是宿主细胞还是裂解的片段。Carter等人,1992,Bio/Technology 10:163-167描述了分离分泌至大肠杆菌周质空间的抗体的程序。简而言之，将细胞糊在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)存在下解冻约30分钟。细胞碎片可通过离心去除。当抗体分泌至培养基中时，来自此类表达系统的上清液通常首先使用市售的蛋白质浓缩过滤器，例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元进行浓缩。可在任何上述步骤中包括蛋白酶抑制剂如PMSF以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0154] 可使用例如羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析和亲和色谱来纯化从细胞制备的抗体组合物，其中亲和色谱是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适用性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc区的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人Ig.γ1、Ig.γ2或Ig.γ4重链的抗体(Lindmark等人,1983,J.Immunol.Meth.62:1-13)。建议将蛋白G用于所有小鼠同种型和人.γ.3(Guss等人,1986,EMBO J 5:1567-1575)。亲和配体所附着的基质最通常是琼脂糖，但也可使用其它基质。

[0155] 与琼脂糖相比，机械稳定的基质，如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯允许更快的流速和更短的处理时间。当抗体包含C_H3域时，Bakerbond ABX™树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)可用于纯化。取决于要回收的抗体，还可使用其它蛋白质纯化技术，例如离子交换柱分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶色谱、肝素色谱、阴离子或阳离子交换树脂(例如聚天冬氨酸柱)上的SEPHAROSE™色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

[0156] 在一个实施方案中，糖蛋白可使用吸附至凝集素底物(例如凝集素亲和柱)上来纯化，以从制剂中去除含岩藻糖的糖蛋白，且因此富集不含岩藻糖的糖蛋白。

[0157] 药物配制物

[0158] 本发明包括抗人APRIL抗体的药物配制物。为了制备药物或无菌组合物，将抗体，特别是抗体或其片段与药学上可接受的载体或赋形剂混合，参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S.Pharmacopeia:National Formulary,Mack Publishing Company,Easton,PA(1984)。治疗剂和诊断剂的配制物可通过与生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂以例如冻干粉末、浆液、水溶液或悬浮液的形式混合来制备(参见例如Hardman等人,2001,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,McGraw-Hill,New York,NY;Gennaro,2000,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott,Williams,and Wilkins,New York,NY;Avis等人(编),1993,Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications,Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(编),1990,Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets,Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(编),1990,Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems,Marcel Dekker,NY;Weiner和Kotkoskie,2000,Excipient Toxicity and Safety,Marcel Dekker,Inc.,New York,NY)。

[0159] 单独或与另一种药剂(例如常用的抗癌药)组合施用的抗体组合物的毒性和治疗功效可通过细胞培养物或实验动物的标准药学程序来确定，例如用于确定LD50(对50％的群体致死的剂量)和ED50(对50％的群体治疗有效的剂量)。毒性与治疗作用之间的剂量比为治疗指数并且它可表示为LD50与ED50的比。从这些细胞培养分析和动物研究中获得的数据可用于配制用于人类的一系列剂量。所述化合物的剂量优选处于包括ED50同时具有极小或无毒性的循环浓度的范围内。剂量可取决于所采用的剂型和所利用的施用途径而在此范围内变化。

[0160] 合适的施用途径包括肠胃外施用，例如肌内、静脉内或皮下施用和经口施用。用于药物组合物或实施本发明方法的抗体的施用可以多种常规方式进行，例如口服摄取、吸入、局部施加或皮肤、皮下、腹膜内、肠胃外、动脉内或静脉内注射。在一个实施方案中，本发明的抗体是静脉内施用的。在另一实施方案中，本发明的抗体是皮下施用的。

[0161] 或者，可以局部而非全身方式施用抗体，例如，通过将抗体直接注射至作用部位，通常以贮库或缓释配制物形式。此外，可在靶向药物递送系统中施用抗体。

[0162] 优选的剂量方案是涉及实现所需治疗效果(例如降低IgA水平)同时避免显著不希望的副作用的最大剂量或剂量频率的方案。如本文所述的抗体的给药可为约每周一次、约每两周一次、约每三周一次、约每4周一次、约每8周一次等，通过静脉内注射或通过皮下注射(例如注入大腿、腹部、上臂等)。每次注射或输注的剂量可为约10至1350mg，例如约50mg、约150mg、约300mg、约450mg、约600mg、约750mg、约1000mg或约1350mg。在某些实施方案中，抗APRIL抗体的给药将通过皮下注射，每个给药事件的剂量(其中“给药事件”是指旨在向个体提供单次施用的一次或多次递送，例如注射，其中施用在个体的相同或不同部位给予)为约600mg，给药频率为每周一次或每两周一次。用于静脉内给药的优选配制物是浓度为约15-25mg/mL或约20mg的缓冲水溶液，而用于皮下给药的优选配制物为约125-175mg或约150mg。这些配制物优选包含L-组氨酸、L-精氨酸、山梨醇和聚山梨醇酯20，pH为6.3±0.2。优选地，L-组氨酸的浓度为约8-12mM或约10mM，L-精氨酸的浓度为约60-90mM或约75mM，山梨醇的浓度为约2.4-3.6％或约3％(w/w)，且聚山梨醇酯20的浓度为约0.008-0.012％或约

0.01％(w/w)。更优选地，水性缓冲溶液包含以下、基本上由以下组成或由以下组成：10mM L-组氨酸、75mM L-精氨酸、3％(w/w)山梨醇和0.01％(w/w)聚山梨醇酯20，pH为6.3±0.2。可使用合适的无菌酸/碱，例如盐酸和氢氧化钠将缓冲水溶液的pH调节至6.3±0.2。用于静脉内输注的配制物可在输注之前在无菌盐水(0.9％)中稀释，例如可将所需量的抗APRIL抗体稀释至约250mL的体积，例如在输注300mg剂量之前，15mL的20mg/mL抗体配制物可用235mL无菌盐水溶液稀释。用于皮下注射的配制物无需进一步稀释即可使用。

[0163] 用于治疗抗体相关病况的本文公开的抗APRIL抗体的治疗有效量和施用频率以及用其治疗的时长可取决于多种因素，包括病况的性质和严重程度、抗体的效力、施用方式、受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食，以及受试者对治疗的反应，并且可由治疗医生确定。抗APRIL抗体可每天一次、每2天一次、每3天一次、每周两次、每周一次、每2周一次、每3周一次、每月一次、每6周一次、每2个月一次或每3个月一次，或以治疗医生认为合适的频率施用。

[0164] 抗APRIL抗体可在至少约1周、2周、1个月(4周)、6周、2个月、3个月、6个月、1年、2年、3年或更长的时间段内，或在治疗医生认为适当的时间段内施用。APRIL相关病况可为慢性病况。慢性病况可存在例如至少约6周、2个月、一年或更长时间。根据个体医疗护理的需要，可在至少约6周、2个月、3个月或6个月、一年或甚至多年的时间段内施用抗体。

[0165] 也可以不规则方式施用抗APRIL抗体以治疗抗体相关病况。就需要较低的总抗体剂量和更快的达到最大目标结合的时间而言，用负荷剂量后跟抗体维持给药(前负荷)早期实现有效的目标抗体浓度(治疗剂量水平)可能比常规疗法更有效。如本文所用，此类施用方案被称为“负荷/维持施用方案”。可在使用负荷剂量的4周或更短、优选3周或更短、更优选2周或更短、最优选1周或更短，包括1天或更短的时间内达到有效的目标抗体浓度。接着在治疗方案的剩余部分期间或直到实现疾病症状的抑制，通过施用相等或较小(或频率较低)的维持剂量来维持目标血清浓度。

[0166] 提及药物施用时，术语“前负荷”是指初始负荷剂量，随后是维持剂量。初始负荷剂量(单次或多次)旨在更快地将动物或人类患者的血清药物浓度增加至有效的目标血清浓度。在各种实施方案中，前负荷通过在3周或更短时间内递送的初始给药来完成，以使抗体达到目标血清浓度。优选地，负荷剂量或一系列剂量施用2周或更短时间，更优选1周或更短时间，例如1天或更短时间。最优选地，负荷给药是单次给药，此后至少一周内没有维持给药，并且负荷给药在1天或更短时间内施用。为了避免对抗体药物的不良免疫反应，可能优选通过静脉注射施用抗体的负荷剂量。本发明包括通过静脉内或皮下施用进行前负荷药物递送的负荷和维持剂量。

[0167] 负荷剂量的施用可为例如以至少约1、2、3、4、5、6、7或8周的时间间隔的一次或多次给药。在一些实施方案中，通过一次或多次静脉内注射施用至少一个负荷剂量，且接着通过一次或多次静脉内或皮下施用来施用至少一个维持剂量。在其它实施方案中，说明书可为通过例如一次或多次静脉内或皮下施用来施用至少一个负荷剂量和通过一次或多次静脉内或皮下施用来施用至少一个维持剂量。在某些实施方案中，至少一个负荷剂量以及至少一个维持剂量均皮下施用。在其它实施方案中，通过静脉内输注施用至少一个负荷剂量，然后皮下施用至少一个维持剂量。例如，治疗方法可包括通过静脉内输注或皮下注射施用150-1350mg负荷剂量的抗APRIL抗体。在负荷剂量后(例如负荷剂量后1周、2周、3周或4周)，

可每4周或更短时间、优选每3周或更短时间、更优选每2周或更短时间、并且在实施方案中每1周或更短时间通过皮下注射施用600mg或更少的抗APRIL抗体的维持剂量。负荷和维持剂量和时间间隔的选择可根据动物或人类患者耐受向身体施用抗体的能力和根据需要达到的APRIL血清水平来进行。

[0168] 药物的负荷剂量可比随后的维持剂量大(例如,大约1.5、2、3、4或5倍)。一个或多个治疗有效维持剂量可为本文所述的任何治疗有效量。负荷剂量可比维持剂量大约2或3倍。抗APRIL抗体可在维持剂量之前以两个(或更多个)负荷剂量施用。抗体或其片段的第一负荷剂量可在第1天施用,第二负荷剂量可在例如约1或2周后施用,并且维持剂量可例如在此后的治疗持续时间内每周施用一次或每2周施用一次。第一负荷剂量可比维持剂量大约3或4倍,并且第二负荷剂量可比维持剂量大约2、3、4、5或更多倍。

[0169] 如本文所用,“抑制”或“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”包括延迟与疾病相关的症状的发展和/或降低将或预期随所述疾病发展的此类症状的严重性。所述术语还包括改善现有症状、预防额外症状以及改善或预防此类症状的根本原因。因此,所述术语表示有益的结果已被赋予患有疾病的脊椎动物受试者。

[0170] 用于治疗目的的本发明的抗体以治疗有效量施用。如本文所用,术语“治疗有效量”或“有效量”是指当单独或与额外治疗剂组合施用于细胞、组织或受试者时可有效预防或改善待治疗的疾病或病况的抗APRIL抗体或其片段的量。治疗有效剂量进一步指足以引起症状的改善,例如相关医学病况的治疗、治愈、预防或改善,或此类病况的治疗、治愈、预防或改善率增加的化合物的量。当应用于单独施用的单个活性成分时,治疗有效剂量是指单独的所述成分。当应用于组合时,治疗有效剂量是指产生治疗效果的活性成分的组合量,无论是组合施用、连续施用还是同时施用。有效量的治疗剂典型地会使症状减少至少10%;通常至少20%;优选至少约30%;更优选至少40%,并且最优选至少50%。

[0171] 与第二治疗剂共同施用或治疗的方法是本领域熟知的,参见例如Hardman等人(编),2001,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第10版,McGraw-Hill,New York,NY;Poole和Peterson(编),2001,Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA;Chabner和Longo(编),2001,Cancer Chemotherapy and Biotherapy,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA。

[0172] 本发明的药物组合物还可含有其它药剂,包括但不限于细胞毒性剂、化疗剂、细胞抑制剂、抗血管生成剂或抗代谢剂、肿瘤靶向剂、免疫刺激剂或免疫调节剂或与细胞毒性剂、细胞抑制剂或其它毒性剂结合的抗体。药物组合物还可与其它治疗方式如手术、化学疗法和放射疗法一起使用。

[0173] 优选实施方案

[0174] 以下是本发明的优选实施方案:

[0175] 1.一种适用于药物输注或皮下注射的抗体配制物,所述抗体配制物包含:

[0176] 浓度为约20mg/mL至约190mg/mL的抗APRIL抗体;

[0177] 约10mM L-组氨酸;

[0178] 约75mM L-精氨酸;

[0179] 约3%重量%山梨醇;

[0180] 约0.01重量%聚山梨醇酯20;以及

[0181] 约6.0至约6.6的pH;

[0182] 其中所述配制物(i)具有约16cP或更低的粘度,(ii)不包含谷氨酸或其盐,(iii)具有约250mOsm/kg至约390mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度,以及(iv)具有小于约1.0的OD330。

[0183] 2.根据实施方案1的抗体配制物,其中在制造所述配制物后,所述配制物在2-8℃下储存9个月后保持所述抗APRIL抗体的至少96%纯度。

[0184] 3.根据实施方案2的抗体配制物,其中在制造所述配制物后,所述配制物在25℃下储存6个月后保持所述抗APRIL抗体的至少95%纯度。

[0185] 4.根据实施方案1-3之一的抗体配制物,其中所述配制物具有在25℃下测量的2.5×10^{-5}mol·mL/g^2或更大的第二维里系数。

[0186] 5.根据实施方案1-4之一的抗体配制物,其中所述配制物具有约7.4或更高的计算等电点。

[0187] 6.根据实施方案1-5之一的抗体配制物,其中配制物中的抗APRIL抗体的浓度为约150mg/mL。

[0188] 7.根据实施方案6的抗体配制物,其中所述配制物具有约290mOsm/kg至约390mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度。

[0189] 8.根据实施方案6或7之一的抗体配制物,其中所述配制物具有约0.8或更小的OD330。

[0190] 9.根据实施方案1-5之一的抗体配制物,其中抗APRIL抗体的浓度为约20mg/mL。

[0191] 10.根据实施方案9的抗体配制物,其中所述配制物具有约293mOsm/kg至约333mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度。

[0192] 11.根据实施方案1-10之一的抗体配制物,其中抗APRIL抗体是人源化抗体,所述人源化抗体包含选自由以下组成的组的重链可变区.轻链可变区对:VH11.VL15、VH12.VL15、VH13.VL15、VH14.VL15、VH14_1.VL15、VH14_1C.VL15、VH14_1D.VL15、VH14_1E.VL15和VH14_1G.VL15。

[0193] 12.根据实施方案1-11之一的抗体配制物,其中所述配制物不含甘氨酸、碳酸盐、HEPES、磷酸盐、柠檬酸盐和乙酸盐。

[0194] 13.一种包含实施方案1-12之一的抗体配制物的单次使用或多次使用小瓶。

[0195] 14.如实施方案13的单次使用或多次使用小瓶,其含有0.5mL至50mL体积的配制物,所述配制物具有约20mg/mL至约190mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

[0196] 15.如实施方案14的单次使用或多次使用小瓶,其中所述配制物具有约20mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

[0197] 16.如实施方案14的单次使用或多次使用小瓶,其中所述配制物具有约150mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

[0198] 17.如实施方案14-16之一的单次使用或多次使用小瓶,其含有5mL体积的配制物。

[0199] 18.一种预填充注射器、自动注射器或注射笔,其包含实施方案1-12之一的抗体配制物。

[0200] 19.如实施方案18的预填充注射器、自动注射器或注射笔,其含有约0.5mL至约

10mL体积的配制物,所述配制物具有约20mg/mL至约190mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

[0201] 20.如实施方案19的预填充注射器、自动注射器或注射笔,其中所述配制物具有约20mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

[0202] 21.如实施方案19的预填充注射器、自动注射器或注射笔,其中所述配制物具有约150mg/mL的抗APRIL抗体浓度。

[0203] 22.如实施方案19-21之一的预填充注射器、自动注射器或注射笔,其含有约2mL体积的配制物。

[0204] 23.一种向有需要的个体施用抗APRIL抗体的方法,所述方法包括通过向个体皮下注射来施用实施方案1-12之一的配制物。

[0205] 24.根据实施方案23的方法,其中所述方法包括以至少每周(QW)时间表重复施用至少2个施用周期。

[0206] 25.根据实施方案23的方法,其中所述方法包括以至少每两周(Q2W)时间表重复施用至少2个施用周期。

[0207] 26.根据实施方案23的方法,其中所述方法包括以至少每4周(Q4W)或每个月(QMT)时间表重复施用至少2个施用周期。

[0208] 27.根据实施方案23-26之一的方法,其中每个给药事件施用总剂量为约10mg至约1350mg的抗APRIL抗体。

[0209] 28.根据实施方案27的方法,其中每次施用递送约2mL浓度为约150mg/mL的抗APRIL抗体的配制物。

[0210] 29.根据实施方案27的方法,其中每次施用递送约4mL浓度为约150mg/mL的抗APRIL抗体的配制物,并且每个给药事件包含一次或多次皮下注射。

[0211] 30.根据实施方案23-29之一的方法,其中将所述配制物皮下施用至个体的大腿、腹部或上臂中的部位。

[0212] 31.一种向有需要的个体施用抗APRIL抗体的方法,所述方法包括通过向个体静脉内输注来施用实施方案1-12之一的配制物。

[0213] 32.根据实施方案31的方法,其中所述方法包括以至少QW时间表重复施用至少2个施用周期。

[0214] 33.根据实施方案31的方法,其中所述方法包括以至少Q2W时间表重复施用至少2个施用周期。

[0215] 34.根据实施方案31的方法,其中所述方法包括以至少Q4W或每月时间表重复施用至少2个施用周期。

[0216] 35.根据实施方案31-34中任一项的方法,其中所述静脉内输注包括:

[0217] 将实施方案1-12之一的配制物在0.9%盐水中稀释至约0.1mg/mL至约10mg/mL的浓度;以及

[0218] 在约2小时的时间段内以单次静脉内剂量的所述稀释配制物向所述个体施用总剂量为约10mg至约1350mg的所述抗APRIL抗体。

[0219] 36.根据实施方案35的方法,其中将15mL浓度为20mg/mL的配制物添加至235mL 0.9%盐水中以提供浓度为1.2mg/mL的静脉内剂量。

[0220] 37.一种向有需要的个体施用抗APRIL抗体的方法,所述方法包括通过负荷/维持

施用方案施用抗APRIL。

[0221] 38.根据实施方案37的方法,其中负荷/维持施用方案的负荷部分包括以比负荷/维持施用方案的维持部分中的抗APRIL抗体浓度更高的浓度一次或多次施用抗APRIL抗体。

[0222] 39.根据实施方案37的方法,其中负荷/维持施用方案的负荷部分包括以比负荷/维持施用方案的维持部分中的抗APRIL抗体的施用频率更高的频率一次或多次施用抗APRIL抗体。

[0223] 40.根据实施方案37至39之一的方法,其中负荷/维持施用方案的负荷部分包括以与负荷/维持施用方案的维持部分中的抗APRIL抗体的施用途径不同的途径一次或多次施用抗APRIL抗体。

[0224] 41.根据实施方案37的方法,其中负荷/维持给药方案的负荷部分包括一次或多次静脉内施用抗APRIL抗体,并且负荷/维持施用方案的维持部分包括一次或多次皮下施用抗APRIL抗体。

[0225] 42.根据实施方案37-41之一的方法,其中抗APRIL抗体是根据实施方案1-12之一的抗体配制物。

[0226] 43.根据实施方案23-41之一的方法,其中有需要的个体具有大于4g/L的血清IgA水平。

[0227] 44.根据实施方案23-41之一的方法,其中有需要的个体是IgA肾病患者。

[0228] 45.根据实施方案23-41之一的方法,其中个体患有高免疫球蛋白血症。

[0229] 现在将参考以下非限制性实验进一步说明和支持本发明。

[0230] 实施例

[0231] 实施例1

[0232] 以下实施例描述了粘度低于16cP的高剂量抗APRIL配制物的开发。使配制物经受温度应力(-70℃、2-8℃、25℃和45℃)、冷冻/解冻循环和温和摇动,以选择最适合散装药物物质和所需浓度的填充药物产品的配制物。配制物在5℃下的预测SE-和CEX-UPLC稳定性分别为大约2年和6年。样品的特征如下:

[0233] 视觉外观(C=透明;O=乳白色;NC=无色;Y=浅黄色;NP=无可见微粒)

[0234] 浓度

[0235] A330 nm的浊度

[0236] 尺寸排阻超高效色谱(SE-UPLC)

[0237] 阳离子交换UPLC(CEX-UPLC)

[0238] 动态光散射/静态光散射

[0239] pH

[0240] 重量摩尔渗透压浓度

[0241] 粘度

[0242] 试剂:

[0243] 抗APRIL抗体:VH14_1G.VL15

[0244]

组氨酸	J.T. Baker	2080-06
精氨酸	J.T. Baker	2066-06
谷氨酸	J.T. Baker	2077.06
山梨醇	EMD Millipore	1.03583.2503
氯化钠	J.T. Baker	7647-145
聚山梨醇酯-20	J.T. Baker	4116.04
哌嗪	Sigma	80621
咪唑	Fluka	56749

[0245]

Tris	Sigma	252859
无水磷酸氢二钠	J.T. Baker	8327-01
磷酸二氢钾	Millipore	7778-77-0

[0246] 共制备了11种配制物(见表2),其中六种配制物的目标浓度>150mg/mL,且五种配制物的浓度为200mg/mL。所有配制物均使用pH 6.1和6.3的组氨酸缓冲液制备。

[0247] 表2:配制物列表

[0248]

	配制物标识	pH	浓度(mg/mL)	精氨酸(mM)	谷氨酸(mM)	山梨醇(%)	NaCl(mM)	0.01% PS20
10 mM组氨酸	1	6.1	>150	150	150	-	-	+
	1	6.1	200	150	150	-	-	+
	2	6.1	>150	55	55	3	-	+
	2	6.1	200	55	55	3	-	+
	3	6.3	>150	55	55	3	-	+
	3	6.3	200	55	55	3	-	+
	4	6.1	>150	55	55	-	80	+
	5	6.3	>150	55	55	-	80	+
	6	6.3	200	150	150	-	-	+
对照	11	6.3	>150		10 mM组氨酸、3%山梨醇、75 mM精氨酸、0.01% PS20, pH 6.3			
	11	6.3	200		10 mM组氨酸、3%山梨醇、75 mM精氨酸、0.01% PS20, pH 6.3			

[0249] 通过切向流过滤(TFF)以40mL/min的最大流速将抗APRIL抗体浓缩至50mg/mL。接着回收浓缩材料并在8500rcf下离心5分钟,并通过0.22μm PVDF膜过滤。用材料填充预水合的10kDa MWCO透析盒并在2-8℃下对200mL缓冲液进行透析(3次更换200mL)。总透析时间为两天。接着将回收的蛋白质样品在10kDa MWCO离心过滤单元中以3750rcf旋转浓缩数小时以达到目标值。浓缩的配制物或者作为过度浓缩的样品(例如>150mg/mL)进行分析,或者使

用相应的缓冲液稀释至特定的目标浓度(例如200mg/mL)。将在相应缓冲液中制备的聚山梨醇酯20(PS20)添加至每一配制物中,最终浓度为0.01%(w/v)。

[0250] 回收率计算和视觉外观观察结果在下表3中示出。在TFF步骤之后,根据蛋白质含量计算出98.2%的回收率。观察到白色混浊溶液。因此,在透析步骤之前对此蛋白质溶液进行离心和过滤以去除粒子。过滤步骤对蛋白质浓度几乎没有影响。在旋转浓缩步骤中,在此筛选中评估的所有预期配制物都达到了>150mg/mL的目标浓度。

[0251] 表3:浓缩步骤期间材料的蛋白质浓度、回收率和视觉外观:

[0252]

	体积 (mL)	浓度 (mg/mL)	材料 (mg)	回收率 (%)	视觉外观
起始材料	315	3.21	1011.2	N.A.	透明,无颜色
TFF后	20.5	48.5	993.8	98.2	浑浊,白色溶液
TFF后,经过滤	20.5	48.5	993.8	100%	透明,无颜色
透析前	2.06	48.5	99.9	N.A.	透明,无颜色
配制物1旋转浓缩后	0.401	190.6	76.4	76.5	透明,淡黄色
配制物2旋转浓缩后	0.446	185.9	82.9	83.0	透明,淡黄色
配制物3旋转浓缩后	0.472	177.8	83.9	84.0	透明,淡黄色
配制物4旋转浓缩后	0.452	155.2	70.2	70.2	透明,淡黄色
配制物5旋转浓缩后	0.446	178.5	79.6	79.7	透明,淡黄色
配制物11旋转浓缩后	0.480	181.2	87.0	87.1	透明,淡黄色

[0253] 下表4总结了本研究获得的分析结果。在这一步,与装入盒中的初始材料量相比,回收率百分比在70.2-87.1%范围内。粘度范围为7.7至15.4cP,配制物1的浓度最高,粘度低。配制物3和11的比较表明,在山梨醇的存在下,精氨酸与谷氨酸的组合产生的粘度低于单独的精氨酸。总体而言,此第一筛选实验表明应避免使用盐以保持低粘度。配制物3和5的比较突出了此发现。总体而言,所有测试配制物的胶体稳定性都是可接受的,A2值为正且在相似范围内。

[0254] 表4:在配制物筛选期间获得的组成、粘度、重量摩尔渗透压浓度和第二维里系数(A2):

[0255]

	标识	pH	精氨酸 (mM)	谷氨酸 (mM)	山梨醇(%)	NaCl (mM)	0.01% PS20	浓度 (mg/mL)	粘度 (cP)	重量摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg)	A2 (mol mL/g^2) X 10^{-5}
10mM组氨酸	#1	6.1	150	150	-	-	+	190.6	12.1	288	3.315
	#2	6.1	55	55	3	-	+	185.9	12.9	274	4.089
	#3	6.3	55	55	3	-	+	177.8	10.5	298	3.670
	#4	6.1	55	55	-	80	+	155.2	7.7	246	1.293
	#5	6.3	55	55	-	80	+	178.5	14.2	243	2.980
	#11 对照	6.3	75	-	3	-	+	181.2	15.4	308	2.792

[0256] 实施例2

[0257] 为了评估获得>200mg/mL蛋白质浓度的可行性，从起始抗APRIL抗体制备新鲜样品。含氯化钠的配制物被排除，因为盐不利于将粘度保持在较低的值。在旋转浓缩步骤中，样品被过度浓缩至239-252mg/mL。值得注意的是，根据A280的蛋白质定量计算，回收率数据低于之前观察到的值，值范围为42.7-69.4%。接着用相应的配制物缓冲液将样品稀释至200mg/mL，同时将PS20含量调节至0.01%的最终浓度。粘度测量值很高，值范围为26.2cP至47.0cP。值得注意的是，在浓度为155-190mg/mL的样品中获取的粘度测量值远低于在200mg/mL的样品中观察到的粘度。这种粘度值的增加表明在极端蛋白质过度浓缩期间发生了某种有害的蛋白质-蛋白质相互作用。尽管离心装置允许浓缩小样品体积，但测试样品在离心过程中确实会经历由g力产生的高跨膜压力，这可能是蛋白质变性的另一个原因。结果在下表5和6中提供。

[0258] 表5：浓缩步骤期间材料的蛋白质浓度、回收率和视觉外观：

[0259]

	体积 (mL)	浓度 (mg/mL)	材料 (mg)	回收率 (%)	视觉外观
起始材料	340.0	3.34	1135.6	N.A.	透明、无色、无粒子

[0260]

TFF 后	28.0	39.5	1106.0	97.4	浑浊，白色溶液
透析前	4.5	39.5	177.8	N.A.	透明、无色、无粒子
配制物 1 旋转浓缩后	0.312	244.7	76.2	42.9	透明、淡黄色、无粒子
配制物 2 旋转浓缩后	0.302	252.1	76.0	42.7	透明、淡黄色、无粒子
配制物 3 旋转浓缩后	0.513	240.8	123.4	69.4	透明、淡黄色、无粒子
配制物 6 旋转浓缩后	0.382	239.2	91.4	51.4	透明、淡黄色、无粒子
配制物 11 旋转浓缩后	0.347	251.9	87.3	49.1	透明、淡黄色、无粒子

[0261] 表6：200mg/mL配制物的组成和粘度：

[0262]

	标识	pH	精氨酸 (mM)	谷氨酸 (mM)	山梨醇 (%)	NaCl (mM)	0.01% PS20	浓度 (mg/mL)	粘度 (cP)
10mM 组氨酸	#1	6.1	150	150	-	-	+	200	47.0
	#2	6.1	55	55	3	-	+	200	38.2
	#3	6.3	55	55	3	-	+	200	29.5
	#6	6.3	150	150	-	-	+	200	33.9
	#11 对照	6.3	75	-	3	-	+	200	26.2

[0263] 为了密切监测190mg/mL至200mg/mL的样品粘度并评估表面活性剂对粘度的影响，从起始抗APRIL抗体制备第三组新鲜样品。在此设置中，制备了配制物1和配制物6。通过TFF使蛋白质达到28.8mg/mL，然后透析12mL TFF后材料。在旋转浓缩过程中，在浓度-180mg/mL

时观察到粘度的定性增加，且达到的最终浓度为~200mg/mL。一半样品保持在最终浓度，而另一半用不含PS20的相应配制物缓冲液达到190mg/mL。在两种浓度下测量粘度，且结果呈现于下表7中。在浓度>200mg/mL的样品中观察到高粘度，配制物1和6的值分别为46.9cP和33.0cP。当通过稀释使样品浓度达到190mg/mL时，粘度降低到34.2cP和22.5cP。用0.01％PS20制备样品使得配制物6的粘度为20cP。

[0264] 表7：190和200mg/mL蛋白质溶液的组成和粘度

[0265]

	标识	pH	精氨酸(mM)	谷氨酸(mM)	0.01% PS20	浓度(mg/mL)	粘度(cP)
10mM组氨酸	#1	6.1	150	150	-	204.3	46.9
	#1	6.1	150	150	-	190.0	34.2
	#6	6.3	150	150	-	201.9	33.0
	#6	6.3	150	150	-	190.0	22.5
	#6	6.3	150	150	+	190.0	20.0

[0266] 实施例3

[0267] 制备了总共四种150mg/mL抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体配制物(下表8)，其含有pH 6.1和6.3的组氨酸缓冲液。将0.6mL体积的测试样品无菌放入2mL玻璃小瓶中，随后将其塞好。表9中提供了使用的稳定性测试条件和分析。

[0268] 表8：研究中测试的配制物的列表

[0269]

配制物	蛋白质浓度(mg/mL)	pH	10mM组氨酸	精氨酸(mM)	谷氨酸(mM)	3%山梨醇	0.01% PS20
1	150	6.1	+	150	150	-	+
3	150	6.3	+	55	55	+	+
6	150	6.3	+	150	150	-	+
11	150	6.3	+	75	-	+	+

[0270] 表9：评估中使用的稳定性测试条件和分析。

[0271]

条件	采样时间点	分析批次	A280 nm	A330 nm	视觉外观(液体)	CEX-UPLC	粘度	SE-UPLC	重量摩尔渗透压浓度	pH	SLS/DLS
-70	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
-70	6周	5	1	1	1	1		1		1	
-70	12周	6	1	1	1	1		1		1	1
(-70C)冷冻/解冻5个循环	1周	3	1	1	1	1		1		1	1
4C-3天摇动	3天	2	1	1	1	1		1		1	1
4C	1周	3	1	1	1	1		1		1	1
4C	3周	4	1	1	1	1		1		1	
4C	6周	5	1	1	1	1		1		1	
4C	12周	6	1	1	1	1		1		1	1
25C	1周	3	1	1	1	1		1		1	

[0272]

25C	3周	4	1	1	1	1		1		1	1
25C	6周	5	1	1	1	1		1		1	
25C	12周	6	1	1	1	1		1		1	1
45C	1周	3	1	1	1	1		1		1	
45C	3周	4	1	1	1	1		1		1	1

[0273] 解冻的抗APRIL抗体以3000rcf离心20分钟，接着在0.22μm膜上过滤以清除观察到的少量粒子。过滤的材料在两天内通过TFF浓缩以达到37.9mg/mL的最终浓度。接着将浓缩的材料放入预水合的10kDa MWCO 70mL容量透析盒中，且在2-8℃下在两天的时间段内对2L缓冲液进行透析(3次更换2L)。接着将回收的蛋白质样品在15℃下在Amicon Ultra-15管(再生纤维素10kDa MWCO)中以2300rcf旋转浓缩，历时数小时，以达到>150mg/mL的目标浓度。将待浓缩的材料分成两半并在两个旋转浓缩器上浓缩，以解决待处理的大体积。一旦达到目标体积，在分析之前，将两半在浓缩步骤后不久合并。在添加表面活性剂之前，将过度浓缩的蛋白质溶液留出用于粘度测试。使用相应的缓冲液将浓缩配制物稀释至150mg/mL的目标。将在相应缓冲液中制备的PS20添加至配制物中，最终浓度为0.01％(w/v)，同时靶向150mg/mL VH14_1G.VL15。在无菌条件下，VH14_1G.VL15配制物通过0.22μm PVDF膜过滤，且接着分配至去热原硼硅酸盐小瓶中，加塞并用铝密封件卷边。接着根据表9将小瓶置于压力条件下进行稳定性测试。在每个必要的时间点，从所述条件中取出样品，并在原始小瓶中进行视觉外观。根据各自的方法规范，对未稀释的样品进行重量摩尔渗透压浓度、粘度、A330、pH和DLS分析，而对稀释的样品进行A280、SE-UPLC和CEX-UPLC分析。重量摩尔渗透压浓度和粘度仅在T＝0时间点进行。任何剩余的样品体积都保留在-70℃下用于备份测试。

[0274] 在各种施加的应力条件下，测定了视觉外观、根据A330的样品浊度、pH和浓度。样品的浓度通过在280nm处使用1.0mg/mL＝1.4AU的消光系数测量吸光度来确定。报告的最终蛋白质浓度针对散射进行了校正((A280-A330)/ε280＝校正的蛋白质浓度)。测定过程中过度浓缩样品(添加PS20之前)以及T＝0样品的样品粘度值。重量摩尔渗透压浓度值仅针对T＝0样品确定。

[0275] 在样品制备步骤期间，将过度浓缩样品的等分试样留出用于粘度测量。粘度范围为12.5至15.6cP。值得注意的是，在12周配制物研究的配制物筛选和样品制备中观察到约190mg/mL样品的粘度差异。这种差异可能是由于在旋转浓缩步骤中处理样品的体积不同，或者是由于本研究中使用的起始材料不同。在稀释步骤期间，所有测试配制物的目标抗体浓度均达到150mg/mL，同时将表面活性剂引入至0.01％ PS20的最终浓度。所得150mg/mL配制物显示6.3至7.8cP的粘度以及324至358mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度。值得注意的是，对制备信息的审查表明，对应于配制物11的缓冲液是在pH 6.1而不是目标pH 6.3下制备的，因此解释了此配制物与目标pH的差异。对于所有观察的时间点，测量的pH值保持在起始值的0.1个单位内。

[0276] 应力培育后，记录了样品的视觉外观、蛋白质浓度、浊度和pH(图1)。在不同的应力条件下，在pH方面没有观察到明显的差异。除了在25℃下培育12周(配制物6)和在45℃下培育3周(配制物3和6)后出现一些粒子外，所有配制物在不同应力条件下的视觉外观均保持透明、淡黄色并且无可见微粒。配制物1和配制物3的浊度值通常较低。在5次冷冻/解冻循环或在2-8℃下摇动3天后，任何配制物中都没有明显的可辨别分析变化。

[0277] 在所有测试配制物中，目标抗体浓度近似为150mg/mL。样品pH值在透析缓冲液的0.1个单位内。注意，配制物11在pH 6.14而不是目标pH 6.30下制备。在不同的应力条件下，所有配制物的视觉外观都保持透明、淡黄色，但在25℃下培育12周(配制物6)和在45℃下培育3周(配制物3和6)后观察到一些微粒。从A330测量的浊度通常在配制物1和3中较低。结果提供在下表10和11中。

[0278] 表10:样品的组成和粘度

[0279]

配制物标识	蛋白质浓度(mg/mL)	pH	10mM组氨酸	精氨酸(mM)	谷氨酸(mM)	3%山梨醇	0.01%PS20	粘度(cP)
1	197	6.1	+	150	150	-	-	15.6
3	189	6.3	+	55	55	+	-	14.1
6	189	6.3	+	150	150	-	-	15.8
11	179	6.3	+	75	-	+	-	12.5

[0280] 表11:T＝0时的pH、重量摩尔渗透压浓度、粘度、A330

[0281]

配制物标识	目标浓度(mg/mL)	目标pH	10mM组氨酸	精氨酸(mM)	谷氨酸(mM)	3%山梨醇	0.01%PS20	pH	实际浓度(mg/mL)	重量摩尔渗透压浓度(mOsm/kg)	粘度(cP)	A330
1	150	6.1	+	150	150	-	+	6.13	159	329	6.5	0.703
3	150	6.3	+	55	55	+	+	6.34	162	324	6.3	0.708
6	150	6.3	+	150	150	-	+	6.36	162	346	7.8	0.753
11	150	6.3	+	75	-	+	+	6.14	165	352	7.6	0.753

[0282] 实施例4

[0283] 尺寸排阻色谱法(也称为凝胶过滤色谱法)基于蛋白质的分子形式的大小将其分离。在此方法中，较大的分子种类(例如聚集体、IgG二聚体和寡聚体)比所需的(单体)IgG种类更早作为前峰洗脱。较小的分子种类(例如降解产物和片段)稍后作为后峰洗脱。对抗体稳定性样品进行SE-UPLC。简而言之，使用流动相将样品稀释至0.5mL/min，且将2.5μg进样于Waters Acquity UPLC BEH 200SEC，1.7μm，4.6×300mm色谱柱上。色谱分离在环境温度下进行，流动相10mM磷酸盐、0.4M NaCl，pH 7.0±0.1的流速为0.2mL/min。

[0284] 通过SE-UPLC获得的表格数据在图2中示出，且相对主峰的图形表示在图3-6中示出。在2-8℃下培育12周后，所有配制物的主峰都降低了0.1-0.3%。当暴露于5个冷冻/解冻循环和2-8℃摇动应力条件时，任何测试配制物之间都没有观察到可辨别差异，因为所得数据与T＝0结果相当并且在分析可变性内。

[0285] 在2-8℃下培育12周后，每种配制物都显示出强大的稳定性，主峰在初始值的0.2-0.4%范围内。所有测试配制物的冷冻/解冻稳定性以及2-8℃摇动应力稳定性都是等效的。在25℃下培育12周后，与其它配制物相比，配制物1(10mM组氨酸、150mM精氨酸、150mM谷氨酸、0.01% PS20，pH 6.1)的纯度略高，但在45℃下三周后情况并非如此，其中观察到主峰

面积下降1.3-1.6％。

[0286] 实施例5

[0287] 离子交换色谱法基于分子的可及表面电荷的差异来分离分子。结合取决于带相反电荷的分子之间的离子吸引力。本文应用的分析使用弱阳离子交换(CEX-UPLC)柱。通过增加pH的梯度完成洗脱。pH梯度分离使用配备有在280nm处监测的UV检测器(A280)和集成软件(Chromeleon 7.2版)的超高效液相色谱系统(Thermo Vanquish)进行。在本申请中使用Dionex ProPac WCX-10柱(4.0×250mm)以在本文描述的稳定性研究过程中解析并提供抗体带电物种的可测量群体的概况。对抗APRIL抗体稳定性样品进行CEX-UPLC。将样品稀释至1mg/mL,且在色谱柱上进样25μg。

[0288] CEX-UPLC获得的表格数据在图7中示出。在2-8℃和-70℃下培育12周后,CEX-UPLC显示主峰变化0.1-0.3％,并且在四种配制物中没有观察到明显的差异或趋势。在25℃和45℃下培育后,观察到主峰和碱性峰水平在稳定性研究期间降低,导致所有配制物的酸性峰增加。相比于pH 6.3,在pH 6.1的配制物中观察到的这些差异较低。根据CEX-UPLC,配制物11(10mM组氨酸、75mM精氨酸、3％山梨醇、0.01％ PS20,pH 6.1)显示出最佳稳定性。在5个冷冻/解冻循环或2-8℃摇动应力后,四种配制物中未观察到明显差异。

[0289] 在-70℃和2-8℃下储存12周后或暴露于冷冻/解冻和2-8℃摇动应力条件后,任何测试配制物之间没有观察到显著变化,因为所得数据与T＝0结果相当并且在分析可变性内。在25℃和45℃下培育后,观察到主峰和碱性峰水平在稳定性研究期间降低,导致所有配制物的酸性峰增加。对于VH14_1G.VL15配制物,观察到pH 6.1下的的这些差异低于pH 6.3下的这些差异。根据CEX-UPLC,配制物11(10mM组氨酸、75mM精氨酸、3％山梨醇、0.01％ PS20,pH 6.1)显示出最佳稳定性。

[0290] 实施例6

[0291] 对稳定性数据的定性审查表明,在样品配制物1(10mM组氨酸、150mM精氨酸、150mM谷氨酸、0.01％ PS20,pH 6.1)中保持了通过SEC样品纯度测量的更高VH14_1G.VL15稳定性,其仅可在25℃和45℃测试条件下观察到。反应速率与其温度之间的关系由阿仑尼乌斯方程描述。

[0292] 方程1

[0293] ln kobs＝(-Ea/R)T+ln A

[0294] 其中k是速率系数,指前因子A通常是小温度范围内的常数,其中包括如碰撞频率和其方向等变量,Ea是活化能,R是通用气体常数,并且T是绝对温度。此方程允许人们估计在给定温度下的反应速率,例如降解,假设分解本质上是热的(例如,与光诱导的相反)并且分解机制不随温度变化。如果满足这些标准,则活化能Ea和指前因子A不应在小温度范围内变化,从而有助于外推至其它(通常较低)温度。

[0295] 在此类情况下,在高温(加速)条件下进行的实验会产生有关低温降解率的有价值信息,而实时降解监测将非常缓慢且成本高昂。尽管加速研究提供了对稳定性问题的快速洞察,但它们不能替代实时稳定性研究。

[0296] 为了以更严格的方式进行数据分析,确定了每种配制物和温度条件下抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体纯度损失的速率常数,以近似一级降解动力学。对于2-8℃、25℃和45℃测试条件,使用SE-UPLC分析中发现的抗体纯度百分比值绘制ln纯度相对于时间的图。结

果在图8中以图形方式表示。根据数据，斜率与降解速率常数(-kobs)相关。媒剂和温度对kobs的依赖性的结果在下表12中示出。

[0297] 表12：媒剂和温度对kobs的依赖性：

[0298]

	45℃		25℃		5℃	
	k*obs*	R^2	k*obs*	R^2	k*obs*	R^2
配制物 1	-0.0006798	0.98885	-0.000068	0.85459	-2.37919×10^{-5}	0.40246
配制物 3	-0.0007657	0.96517	-0.000077	0.68408	-4.60249×10^{-5}	0.90271
配制物 6	-0.0006805	0.98885	-0.000077	0.93795	-1.90437×10^{-5}	0.77275
配制物 11	-0.0006373	0.82541	-0.000094	0.85977	-2.85547×10^{-5}	0.57972

[0299] 使用来自表12的数据，为每种抗APRIL抗体配制物在三种稳定温度下生成了阿伦尼乌斯图(ln kobs相对于1/T)(图9)。从此分析中，获得了线的拟合参数(表13)。ln kobs与1/T的良好线性拟合表明在测试的温度范围内运行的分解机制类似。此外，这意味着分解遵循阿伦尼乌斯行为。

[0300] 表13：每种配制物的ln kobs相对于1/T的线性回归分析得到的拟合参数：

[0301]

配制物	斜率	截距	R^2
配制物1	-7343.5	15.52	0.9375
配制物3	-6122.8	11.72	0.8558
配制物6	-7861.2	17.24	0.9733
配制物11	-6823.9	13.92	0.9701

[0302] 根据方程1的阿伦尼乌斯关系，其中斜率＝-Ea/R且截距＝ln A，接着使用数据计算每种媒剂在5℃和25℃下的ln kobs。此外，根据5℃下的kobs并使用方程2中所示的一级动力学速率方程的线性形式，其中k是观察到的速率常数(kobs)，并且纯度$_0$和纯度$_t$分别是时间0和t的纯度，计算了$t_{95\%}$，它对应于直至VH14_1G.VL15溶液纯度将接近总样品组成的95％(或原始纯度的98.1％)的培育天数。经计算，溶液稳定性在5℃下介于1.55至3.06年范围内，或在25℃下介于0.35至0.47年范围内。结果提供于表14中。

[0303] 方程2

[0304] ln(纯度$_t$/纯度$_0$)＝kobst

[0305] 表14：在5℃和25℃下储存的降解率和$t_{95\%}$：

[0306]

	kobs		$t_{95\%}$ (年)		84天时观察到的纯度%	
	5℃	25℃	5℃	25℃	2-8℃	25℃
1：10mM组氨酸、150mM精氨酸、150mM谷氨酸、0.01% PS20，pH 6.1	1.89E-05	0.000111	2.78	0.47	96.5	96.2
3：10mM组氨酸、55mM精氨酸、55mM谷氨酸、3%山梨醇、0.01% PS20，pH 6.3	3.39E-05	0.000148	1.55	0.35	96.4	96.0
6：10mM组氨酸、150mM精氨酸、150mM谷氨酸、0.01% PS20，pH 6.3	1.63E-05	0.000108	3.06	0.46	96.5	96.0
11：10mM组氨酸，75mM精氨酸、3%山梨醇、0.01% PS20，pH 6.1	2.47E-05	0.000128	2.13	0.41	96.5	95.9

[0307] 实施例7

[0308] 按照相同的定量方法，可使用收集的CEX-UPLC数据估计达到原始值的95%的样品纯度。CEX-UPLC数据用于绘制图10中所示的ln纯度相对于时间。使用数据生成的线表示伪一级降解动力学，如下表15中所示，至少对于45℃和25℃测试样品，其中斜率与降解速率常数(-kobs)相关。为每种VH14_1G.VL15配制物在45℃和25℃下生成阿伦尼乌斯图(图11)。2-8℃数据不包括在AR计算中，因为观察到非伪一级变化。

[0309] 表15：来自图10中生成的线的线数据。

[0310]

	45℃		25℃		2-8℃	
	k*obs*	R^2	k*obs*	R^2	K*obs*	R^2
配制物1	-0.0171336	0.94256	-0.000961	0.98253	1.1153×10^{-5}	0.08105
配制物3	-0.0181774	0.94789	-0.000983	0.98618	1.79324×10^{-5}	0.20944
配制物6	-0.0198759	0.95578	-0.001215	0.98971	-2.85854×10^{-5}	0.16211
配制物11	-0.0151533	0.95665	-0.000743	0.98310	-4.26581×10^{-5}	0.30740

[0311] 根据阿伦尼乌斯关系，接着使用表15的数据计算每种媒剂在5℃和25℃下的ln kobs。此外，根据kobs并使用一级动力学速率方程的线性形式，其中k是观察到的速率常数(kobs)，以及纯度$_0$和纯度$_t$，计算了$t_{95\%}$，它对应于直至VH14_1G.VL15溶液纯度将接近原始样品纯度的95%的培育年数(参见表16和17)。经计算，溶液稳定性在5℃下介于2.83至5.95年范围内，且在25℃下介于0.12-0.19年范围内。

[0312] 表16：每种配制物的ln kobs相对于1/T的线性回归分析得到的拟合参数：

[0313]

配制物	斜率	截距
配制物1	-13661.8	38.87

配制物3	-13838.4	39.49
配制物6	-13255.1	37.74
配制物11	-14300.4	40.76

[0314] 表17:在5℃和25℃下储存的降解率和$t_{95\%}$

	kobs		$t_{95\%}$ (年)		84天时观察到的主峰%	
	5℃	25℃	5℃	25℃	2-8℃	25℃
[0315] 配制物1: 10mM组氨酸、150mM精氨酸、150mM谷氨酸、0.01% PS20, pH 6.1	3.56E-05	0.000961	3.94	0.15	63.3	58.5
配制物3:10mM组氨酸、55mM精氨酸、55mM谷氨酸、3%山梨醇、0.01% PS20, pH 6.3	3.49E-05	0.000983	4.03	0.14	63.3	58.3
[0316] 配制物6: 10mM组氨酸、150mM精氨酸、150mM谷氨酸、0.01% PS20, pH 6.3	4.97E-05	0.001215	2.83	0.12	63.1	57.2
配制物11: 10mM组氨酸、75mM精氨酸、3%山梨醇、0.01% PS20, pH 6.1	2.36E-05	0.000743	5.95	0.19	63.3	59.5

[0317] 实施例8

[0318] 动态光散射(DLS)用于确定分子的流体动力学半径。它通过捕获由于分子布朗运动引起的散射光强度波动来测量溶液中分子的平移扩散。如果假设分子是一个均匀的球体,则扩散系数可通过斯托克斯-爱因斯坦关系(Stokes-Einstein relationship)转换为分子的流体动力学半径。对每个时间点的VH14_1G.VL15稳定性样品进行DLS分析。简而言之,最初进行缓冲空白以测量每种配制物的散射;接着从测试样品读数中减去此值以最小化缓冲效应。将10μL体积的每个未稀释、未过滤的测试样品装入干净的1μL NanoStar石英比色皿中,并在25℃下在50秒采集的测量时间段内进行分析,每次采集5秒。在此研究中,通过正则化方法分析了用于确定扩散系数的DLS强度自相关数据,所述方法提供了溶液中存在的所有物种的半径和相对丰度的估计值。如Wyatt Technology DYNAMIC 7.1.9中所述,可接受的DLS数据应具有平滑且连续的自相关函数,从最大强度相关值2到值1呈指数衰减。所有测试样品都显示出可接受的衰减。

[0319] 可观察到的粒子种类的流体动力学半径汇总在图12中。汇总表中的数据是含有十次采集的第一次测量获得的值。每次测量的主要群体的详细结果显示于下表18-21中。

[0320] 表18:配制物1样品中的主要物种群体的半径、多分散性和丰度:

	半径 (nm)	Pd%	质量%	强度%	数目%
[0321] 配制物1, t=0	6.8	7.8	99.7	92.5	100.0
配制物1, t=0	7.1	19.3	99.6	93.8	100.0

[0322]

配制物 1，t=3 天，摇动	6.7	2.9	99.4	92.1	100.0
配制物 1，t=3 天，摇动	7.1	22.5	99.6	91.9	100.0
配制物 1，t=1 周，F/T	6.6	5.9	99.7	91.7	100.0
配制物 1，t=1 周，F/T	6.8	17.7	99.5	92.5	100.0
配制物 1，t=1 周，2-8℃	6.9	20.1	99.6	94.4	100.0
配制物 1，t=1 周，2-8℃	6.8	17.8	99.8	93.0	100.0
配制物 1，t=1 周，25℃	7.0	24.5	99.8	94.7	100.0
配制物 1，t=1 周，25℃	6.8	11.7	99.8	93.5	100.0
配制物 1，t=1 周，45℃	6.9	29.7	99.6	86.8	100.0
配制物 1，t=1 周，45℃	6.5	16.6	99.6	87.3	100.0
配制物 1，t=3 周，2-8℃	6.9	7.6	99.1	89.0	100.0
配制物 1，t=3 周，2-8℃	7.0	16.2	99.6	93.8	100.0
配制物 1，t=3 周，25℃	6.6	7.3	99.6	92.8	100.0
配制物 1，t=3 周，25℃	6.7	17.9	99.9	95.1	100.0
配制物 1，t=3 周，45℃	6.4	9.5	99.6	85.7	100.0
配制物 1，t=3 周，45℃	6.4	18.0	99.4	84.2	100.0
配制物 1，t=6 周，-70℃	6.9	17.4	99.8	93.0	100.0
配制物 1，t=6 周，-70℃	7.4	22.8	99.5	98.3	100.0
配制物 1，t=6 周，2-8℃	6.9	6.3	98.8	92.2	100.0
配制物 1，t=6 周，2-8℃	6.9	7.2	99.3	93.2	100.0
配制物 1，t=6 周，25℃	7.1	9.9	99.8	95.6	100.0
配制物 1，t=6 周，25℃	7.3	16.4	99.8	95.3	100.0
配制物 1，t=12 周，-70℃	7.0	22.8	99.7	91.1	100.0
配制物 1，t=12 周，-70℃	7.2	16.9	99.7	93.2	100.0
配制物 1，t=12 周，2-8℃	6.6	8.8	99.8	94.2	100.0
配制物 1，t=12 周，2-8℃	6.8	17.6	99.6	92.4	100.0
配制物 1，t=12 周，25℃	6.9	6.6	99.8	94.9	100.0
配制物 1，t=12 周，25℃	7.0	10.4	99.6	94.8	100.0

[0323] 表19:配制物3样品中的主要物种群体的半径、多分散性和丰度:

[0324]

	半径 (nm)	Pd%	质量%	强度%	数目%
配制物 3，t=0	7.3	22.5	99.7	96.2	100.0
配制物 3，t=0	7.4	25.2	99.7	96.5	100.0
配制物 3，t=3 天，摇动	6.9	17.2	99.7	93.2	100.0
配制物 3，t=3 天，摇动	6.9	18.2	99.7	93.8	100.0
配制物 3，t=1 周，F/T	6.2	11.7	99.6	87.1	100.0
配制物 3，t=1 周，F/T	7.1	32.3	99.8	95.3	100.0
配制物 3，t=1 周，2-8℃	7.2	16.8	99.6	97.3	100.0
配制物 3，t=1 周，2-8℃	7.2	19.5	99.6	95.7	100.0

[0325]

配制物 3，t=1 周，25℃	7.6	29.1	99.9	98.1	100.0
配制物 3，t=1 周，25℃	7.1	19.6	99.5	97.3	100.0
配制物 3，t=1 周，45℃	7.1	16.8	99.5	93.2	100.0
配制物 3，t=1 周，45℃	7.2	19.6	99.6	94.0	100.0
配制物 3，t=3 周，2-8℃	7.0	12.3	99.7	96.1	100.0
配制物 3，t=3 周，2-8℃	6.8	5.0	99.8	95.1	100.0
配制物 3，t=3 周，25℃	6.7	7.4	99.8	96.7	100.0
配制物 3，t=3 周，25℃	7.0	19.9	99.8	96.6	100.0
配制物 3，t=3 周，45℃	7.1	15.5	99.5	89.3	100.0
配制物 3，t=3 周，45℃	7.0	6.1	99.5	88.9	100.0
配制物 3，t=6 周，-70℃	6.9	4.5	99.8	92.8	100.0
配制物 3，t=6 周，-70℃	7.4	17.9	99.8	95.2	100.0
配制物 3，t=6 周，2-8℃	7.4	13.6	99.8	95.8	100.0
配制物 3，t=6 周，2-8℃	7.2	10.6	99.6	95.5	100.0
配制物 3，t=6 周，25℃	6.9	2.9	99.7	95.8	100.0
配制物 3，t=6 周，25℃	7.3	16.8	99.1	97.2	100.0
配制物 3，t=12 周，-70℃	7.2	15.2	99.6	95.3	100.0
配制物 3，t=12 周，-70℃	7.2	20.8	99.8	95.4	100.0
配制物 3，t=12 周，2-8℃	7.0	7.6	99.6	96.4	100.0
配制物 3，t=12 周，2-8℃	7.0	9.2	99.6	96.7	100.0
配制物 3，t=12 周，25℃	7.3	10.6	99.3	96.6	100.0
配制物 3，t=12 周，25℃	7.2	9.1	99.2	96.8	100.0

[0326] 表20：配制物6样品中的主要物种群体的半径、多分散性和丰度：

[0327]

	半径 (nm)	Pd%	质量%	强度%	数目%
配制物 6，t=0	6.9	17.7	99.6	90.5	100.0
配制物 6，t=0	6.6	16.3	99.7	87.4	100.0
配制物 6，t=3 天，摇动	7.3	9.4	99.3	92.5	100.0
配制物 6，t=3 天，摇动	7.4	11.7	99.3	93.4	100.0
配制物 6，t=1 周，F/T	7.3	19.7	99.5	91.5	100.0
配制物 6，t=1 周，F/T	7.3	17.5	99.4	92.3	100.0
配制物 6，t=1 周，2-8℃	7.3	10.3	99.3	93.2	100.0
配制物 6，t=1 周，2-8℃	7.4	10.6	99.3	93.5	100.0
配制物 6，t=1 周，25℃	7.2	12.2	99.6	94.5	100.0
配制物 6，t=1 周，25℃	7.0	7.6	99.7	93.0	100.0
配制物 6，t=1 周，45℃	7.4	21.1	99.0	87.2	100.0
配制物 6，t=1 周，45℃	7.4	22.0	99.1	87.5	100.0
配制物 6，t=3 周，2-8℃	7.0	10.0	99.5	94.0	100.0
配制物 6，t=3 周，2-8℃	6.9	8.6	99.5	93.3	100.0

[0328]

配制物 6，t=3 周，25℃	7.0	7.2	99.1	95.3	100.0
配制物 6，t=3 周，25℃	7.1	11.8	99.6	95.8	100.0
配制物 6，t=3 周，45℃	7.3	13.2	98.9	83.4	100.0
配制物 6，t=3 周，45℃	7.5	23.6	99.1	83.8	100.0
配制物 6，t=6 周，-70℃	7.6	15.3	99.5	91.9	100.0
配制物 6，t=6 周，-70℃	7.6	16.7	99.3	91.7	100.0
配制物 6，t=6 周，2-8℃	7.4	15.7	99.5	94.1	100.0
配制物 6，t=6 周，2-8℃	7.4	10.4	99.4	94.0	100.0
配制物 6，t=6 周，25℃	7.5	15.1	99.5	95.3	100.0
配制物 6，t=6 周，25℃	7.7	23.4	99.5	95.9	100.0
配制物 6，t=12 周，-70℃	7.4	13.5	99.4	94.0	100.0
配制物 6，t=12 周，-70℃	7.4	15.8	99.4	93.2	100.0
配制物 6，t=12 周，2-8℃	7.4	13.5	99.5	95.3	100.0
配制物 6，t=12 周，2-8℃	7.4	13.8	99.6	95.0	100.0
配制物 6，t=12 周，25℃	7.4	10.4	99.2	94.2	100.0
配制物 6，t=12 周，25℃	7.3	10.9	99.4	94.4	100.0

[0329] 表21:配制物11样品中的主要物种群体的半径、多分散性和丰度：

[0330]

	半径 (nm)	Pd%	质量%	强度%	数目%
配制物 11，t=0	7.9	13.9	99.3	94.2	100.0
配制物 11，t=0	7.7	11.8	99.2	93.6	100.0
配制物 11，t=3 天，摇动	7.8	12.9	98.9	94.0	100.0
配制物 11，t=3 天，摇动	7.9	16.7	99.1	92.1	100.0
配制物 11，t=1 周，F/T	6.9	17.4	99.4	92.0	100.0
配制物 11，t=1 周，F/T	6.6	11.9	99.8	86.7	100.0
配制物 11，t=1 周，2-8℃	8.0	23.0	99.6	93.4	100.0
配制物 11，t=1 周，2-8℃	7.7	13.1	99.3	93.6	100.0
配制物 11，t=1 周，25℃	7.8	14.7	99.4	93.9	100.0
配制物 11，t=1 周，25℃	7.3	10.5	98.0	91.8	100.0
配制物 11，t=1 周，45℃	7.8	12.2	98.9	87.1	100.0
配制物 11，t=1 周，45℃	7.9	19.8	98.9	87.0	100.0
配制物 11，t=3 周，2-8℃	7.5	16.6	99.6	91.7	100.0
配制物 11，t=3 周，2-8℃	7.8	24.1	99.6	94.1	100.0
配制物 11，t=3 周，25℃	7.3	10.6	99.8	94.4	100.0
配制物 11，t=3 周，25℃	7.3	9.6	99.4	93.9	100.0
配制物 11，t=3 周，45℃	7.8	36.0	99.0	78.5	100.0
配制物 11，t=3 周，45℃	7.3	21.6	98.7	78.8	100.0
配制物 11，t=6 周，-70℃	7.8	22.8	99.3	93.9	100.0
配制物 11，t=6 周，-70℃	7.8	23.9	99.4	93.4	100.0

[0331]

配制物11，t=6周，2-8℃	7.7	11.9	99.6	92.9	100.0
配制物11，t=6周，2-8℃	8.3	12.0	99.5	94.8	100.0
配制物11，t=6周，25℃	7.6	11.6	99.2	90.9	100.0
配制物11，t=6周，25℃	7.6	12.0	98.9	91.4	100.0
配制物11，t=12周，-70℃	8.1	13.4	99.1	93.2	100.0
配制物11，t=12周，-70℃	8.1	17.1	99.2	93.1	100.0
配制物11，t=12周，2-8℃	7.9	12.2	99.5	94.5	100.0
配制物11，t=12周，2-8℃	8.2	16.3	99.3	93.8	100.0
配制物11，t=12周，25℃	8.2	15.8	99.2	95.0	100.0
配制物11，t=12周，25℃	8.2	11.2	98.9	95.0	100.0

[0332] 在研究开始时，在T＝0时观察到样品的双峰分布，另外一个群体显示流体动力学半径在>10^2nm范围内。对于T＝0的样品，表18至表21中呈现的多分散性在7.8％至25.2％范围内。在研究开始时，主要群体代表了质量％≥99.3％的主要物种。总体而言，无论储存条件如何，主要群体的粒度和相对丰度在整个研究过程中保持可比。DLS测量揭示流体动力学粒度在6.8至7.9nm范围内，具体取决于配制物组成。在T＝0时观察到样品的双峰分布，另外一个群体显示流体动力学半径在>10^2nm范围内。在研究开始时，主要群体代表了质量％≥99.3％的主要物种。总体而言，无论储存条件或配制物如何，主要群体的粒度和相对丰度在整个研究过程中保持可比。

[0333] 实施例9

[0334] 制备了总共五种抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体配制物，其中四种为20mg/mL且一种为50mg/mL，含有pH 6.0至6.5范围内的组氨酸缓冲液(表22)。将1.2mL体积的测试样品无菌放入2mL玻璃小瓶中，随后将其塞好。在每个必要的时间点，从所述条件中取出样品，并在原始小瓶中进行视觉外观。对未过滤的样品进行A330和pH分析，而使用0.2μm过滤的样品进行A280、SEC和CEX，以去除可能干扰分析的粒子。对于HIAC分析，将0.75mL体积的稳定性样品用相应的缓冲液按1:1稀释，以提供足够的体积用于分析。重量摩尔渗透压浓度和粘度仅在T＝0时间点进行。任何剩余的样品体积都保留在-70℃下用于备份测试。

[0335] 表22:配制物列表。

[0336]

配制物标识	pH	浓度(mg/mL)	10 mM组氨酸	精氨酸(mM)	谷氨酸(mM)	山梨醇%(w/w)	0.01%(w/v)PS20
#11	6.0	20	+	110		1.5	+
#12	6.3	20	+	75		3	+
#13	6.5	50	+	75		3	+
#14	6.5	20	+	75		3	+
#15	6.5	20	+	55	55	3	+

[0337] 记录制备后的测试样品pH、浓度、粘度和重量摩尔渗透压浓度。在20mg/mL时，所有四种配制物的粘度均为1.2cP。50mg/mL配制物的粘度略高，为1.5cP。重量摩尔渗透压浓度值范围为293-377mOsm。结果在下表23中提供。

[0338] 表23:pH、重量摩尔渗透压浓度和粘度测量结果

[0339]

配制物#标识	pH	测量的pH	浓度(mg/mL)	重量摩尔渗透压浓度(mOsm/kg)	粘度(mPa·s)
#11	6.0	6.1	20.2	296	1.2
#12	6.3	6.4	20.2	333	1.2
#13	6.5	6.6	47.8	337	1.5
#14	6.5	6.6	20.1	328	1.2
#15	6.5	6.5	20.4	293	1.2

[0340] 应力培育后，如图13中所示，记录了样品的视觉外观、蛋白质浓度、浊度和pH。在不同的应力条件下，在蛋白质浓度和pH方面没有观察到差异。在不同的应力条件下，所有配制物的视觉外观保持透明、无色且无可见微粒。总体而言，25℃和45℃培育后的浊度值表明，精氨酸和山梨醇的配制物在pH 6.3下的稳定性最高。在5X F/T或在2-8℃下摇动3天后，任何配制物均没有明显的分析变化(表24)。

[0341] 表24:冷冻/解冻和摇动应力后的组成、浊度、视觉外观和pH表格结果：

[0342]

样品组成	VH14_1G.VL15 浓度(mg/mL)浊度(A330) *视觉外观**		
	测量的 pH		
	t=0	F/T, 5x	摇动 3 天

[0343]

10 mM 组氨酸、110 mM 精氨酸、1.5%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.0, 20 mg/mL	20.2 0.099 *C、NC、NP* 6.1	20.0 0.099 *C、NC、NP* 6.1	20.5 0.099 *C、NC、NP* 6.1
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.3, 20 mg/mL	20.2 0.102 *C、NC、NP* 6.4	20.1 0.103 *C、NC、NP* 6.4	20.2 0.100 *C、NC、NP* 6.4
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 50 mg/mL	47.8 0.226 *C、NC、NP* 6.6	46.6 0.220 *C、NC、NP* 6.6	51.4 0.225 *C、NC、NP* 6.6
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 20 mg/mL	20.1 0.112 *C、NC、NP* 6.6	20.2 0.069 *C、NC、NP* 6.6	20.4 0.107 *C、NC、NP* 6.6
10 mM 组氨酸、55 mM 精氨酸、55 mM 谷氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 20 mg/mL	20.4 0.101 *C、NC、NP* 6.5	20.0 0.066 *C、NC、NP* 6.6	21.0 0.097 *C、NC、NP* 6.6

[0344] *C＝透明;O＝乳白色;NC＝无颜色;NP＝无微粒

[0345] 实施例10

[0346] 此程序适用于所有需要在分析和配制物开发(AFD)实验室使用HIAC 9703液体粒子计数系统进行粒度和计数测试的液体样品。HIAC由采样器、粒子计数器和Royco传感器

(HRLD 400传感器)组成。Royco传感器能够测量和计数2μm至100μm的粒子。所述仪器可计数≤10,000个计数/mL的粒子。此方法未经验证,并且仅用于开发目的。

[0347] 简而言之,样品和对照是在生物安全柜中制备的,以防止添加来自环境的粒子。将0.75mL体积的稳定性样品用相应的缓冲液按1:1稀释,以提供足够的体积用于分析。对照由用作系统适用性样品的纯化水(用于确保在制备过程中没有引入粒子)和安慰剂样品组成,所述安慰剂样品基本上是置于条件下的缓冲液。

[0348] 将样品和对照脱气两小时,且接着使用HIAC系统进行分析。HIAC方法由从每个样品中连续运行六次0.2mL体积组成。前三次运行用于平衡传感器且因此被忽略,且对后三(3)次运行的平均粒子计数取平均值,以提供以计数/mL为单位的粒子计数。

[0349] 图14报告了由HIAC测量的粒度和计数。在任何测试抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体配制物之间未观察到显著变化,因为所得数据与t=0结果相当并且在分析可变性内;因此它们都同样稳定。当暴露于冷冻/解冻和2-8℃摇动应力条件时,任何测试配制物之间都没有观察到显著变化,因为所得数据与t=0结果相当并且在分析可变性内(表25)。

[0350] 表25:HIAC:冷冻/解冻和摇动应力后配制物的表格结果。

样品组成	计数/mL (直径) 2 μm 3 μm 5 μm ≥ 10 μm ≥ 25 μm		
	t=0	F/T, 5x	摇动 3 天
10 mM 组氨酸、110 mM 精氨酸、1.5% 山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.0 20 mg/mL	183 ± 29 133 ± 29 70 ± 26 23 ± 15 3 ± 6	247 ± 90 177 ± 74 63 ± 15 10 ± 10 0 ± 0	73 ± 21 57 ± 15 27 ± 6 10 ± 0 0 ± 0
[0351] 10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.3 20 mg/mL	63 ± 35 40 ± 20 20 ± 17 10 ± 10 0 ± 0	90 ± 20 57 ± 21 33 ± 15 17 ± 15 0 ± 0	60 ± 10 47 ± 6 20 ± 17 17 ± 12 3 ± 6
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 50 mg/mL	130 ± 62 73 ± 25 43 ± 25 10 ± 10 0 ± 0	173 ± 55 117 ± 50 40 ± 20 10 ± 10 0 ± 0	87 ± 21 63 ± 15 33 ± 6 10 ± 10 3 ± 6
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 20 mg/mL	37 ± 15 30 ± 10 13 ± 6	127 ± 46 87 ± 25 40 ± 17	73 ± 31 60 ± 26 33 ± 15

[0352]

	3 ± 6 0 ± 0	17 ± 15 0 ± 0	13 ± 15 0 ± 0
10 mM组氨酸、55 mM精氨酸、55 mM谷氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 20 mg/mL	67 ± 29 37 ± 15 23 ± 15 7 ± 12 0 ± 0	263 ± 64 163 ± 21 50 ± 17 7 ± 12 0 ± 0	80 ± 26 67 ± 31 37 ± 6 17 ± 6 7 ± 12

[0353] 实施例11

[0354] 尺寸排阻色谱法(也称为凝胶过滤色谱法)基于蛋白质的分子形式的大小将其分离。在此方法中,较大的分子种类(例如聚集体、IgG二聚体和寡聚体)比所需的(单体)IgG种类更早作为前峰洗脱。较小的分子种类(例如降解产物和片段)稍后作为后峰洗脱。根据CMC13415项目#5-0091纯度通过SE-UPLC方法,使用Waters Acquity UPLC BEH200SEC,1.7μm,4.6×300mm柱和10mM磷酸盐、0.4M NaCl、pH7.0流动相,对抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体稳定性样品进行SE-UPLC。

[0355] 在45℃下储存1、2和4周后,纯度结果表明,与其它三种相同浓度的20mg/mL配制物相比,含有精氨酸/山梨醇的配制物在pH 6.0下的稳定性最低(图15)。在25℃和45℃下培育后,含有20mg/mL或50mg/mL抗APRIL抗体的精氨酸/山梨醇pH 6.5的两种配制物之间的比较表明浓度依赖性稳定性,其中50mg/mL的较高浓度配制物的稳定性较差。在-70℃和2-8℃下储存12周后,任何测试配制物之间均未观察到显著变化。

[0356] 当暴露于冷冻/解冻和2-8℃摇动应力条件时,任何测试配制物之间都没有观察到显著变化,因为所得数据与t＝0结果相当并且在分析可变性内(表26)。

[0357] 表26:SE-HPLC:冷冻/解冻和摇动应力后配制物的表格结果。

[0358]

	SE-HPLC (纯度%) HMW 主峰

	LMW		
样品组成	t=0	F/T, 5x	摇动 3 天
10 mM 组氨酸、110 mM 精氨酸、1.5% 山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.0 20 mg/mL	1.1 98.8 0.1	1.1 98.7 0.1	1.1 98.8 0.1
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.3 20 mg/mL	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 50 mg/mL	1.2 98.8 0.1	1.2 98.8 0.1	1.2 98.7 0.1
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 20 mg/mL	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1
10 mM 组氨酸、55 mM 精氨酸、55 mM 谷氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5, 20 mg/mL	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1

[0359]

[0360] 实施例12

[0361] 离子交换色谱法基于分子的可及表面电荷的差异来分离分子。结合取决于带相反电荷的分子之间的离子吸引力。本文应用的分析使用弱阳离子交换(CE-HPLC)柱。通过增加pH的梯度完成洗脱。pH梯度分离使用高效液相色谱系统(Agilent 1260)进行,所述系统配备有在280nm处监测的UV检测器(A280)和集成软件(Chemstation C.01.07版软件包)。在本申请中使用Dionex ProPac WCX-10柱(4.0×250mm)以在本文描述的稳定性研究过程中解析并提供抗APRIL抗体带电物种的可测量群体的概况。

[0362] 在25℃和45℃下培育后,观察到主峰和碱性峰水平在稳定性研究期间降低,导致所有配制物的酸性峰增加。对于配制物,观察到pH 6.0和pH 6.3下的这些差异低于较高pH 6.5下的这些差异。在25℃和45℃下培育后,观察到浓度依赖性稳定性,其中与含有20mg/mL抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体的相同配制物相比,50mg/mL配制物观察到更高的稳定性。有趣的是,这与SE-UPLC确定的结果不同。在-70℃和2-8℃下储存12周后或暴露于冷冻/解冻和2-8℃摇动应力条件后,任何测试配制物之间没有观察到显著变化,因为所得数据与t=0结果相当并且在分析可变性内(表27)。

[0363] 表27:CE-HPLC:冷冻/解冻和摇动应力后配制物的表格结果。

[0364]

样品组成	CE-HPLC (纯度%) 酸性配制物主峰 碱性配制物		
	t=0	F/T, 5x	摇动 3 天
10 mM 组氨酸、110 mM 精氨酸、1.5%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.0 20 mg/mL	14.7 63.2 22.1	14.6 63.8 21.6	14.2 63.9 21.9
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.3 20 mg/mL	14.9 62.9 22.2	14.8 63.8 21.5	14.0 64.1 21.9
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 50 mg/mL	14.7 63.1 22.2	14.8 63.8 21.4	14.4 63.8 21.9
10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5 20 mg/mL	15.0 63.1 21.9	14.7 63.9 21.4	14.1 64.1 21.8
10 mM 组氨酸、55 mM 精氨酸、55 mM 谷氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20, pH 6.5, 20 mg/mL	14.7 63.4 21.8	14.7 64.0 21.3	14.2 63.9 21.9

[0365] 实施例13

[0366] 为了以更严格的方式进行数据分析，确定了每种配制物和温度条件下抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体纯度损失的速率常数，以近似一级降解动力学。对于25℃和45℃测试条件，使用SEC-HPLC分析中发现的VH14_1G.VL15纯度百分比值绘制ln纯度相对于时间的图。结果在图17和18中以图形方式表示。使用数据生成的直线表示伪一级降解动力学，其中斜率与降解速率常数(-kobs)相关(表28)。

[0367] 表28:媒剂和温度对kobs的依赖性。

[0368]

	45℃		25℃	
	k*obs*	R^2	k*obs*	R^2
配制物 1	5.54E-04	0.95292	2.99×10^{-5}	0.82759

[0369]

配制物 2	3.82E-04	0.91694	2.99×10^{-5}	0.82759
配制物 3	4.66E-04	0.86303	7.25×10^{-5}	0.85329
配制物 4	3.74E-04	0.94912	5.56×10^{-5}	0.89855
配制物 5	3.11E-04	0.94055	2.56×10^{-5}	0.90567

[0370] 使用这些数据，为每种抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体配制物在三种稳定温度下生成了阿伦尼乌斯图(ln kobs相对于1/T)(图19)。获得了线的拟合参数(表29)。请注意，通常在阿伦尼乌斯图中使用至少三种温度，但是由于在2-8℃下12周后没有观察到纯度损失，因此在这种情况下不可能。ln kobs与1/T的良好线性拟合表明在测试的温度范围内运行的分解机制类似。此外，这意味着分解遵循阿伦尼乌斯行为。

[0371] 表29:每种配制物的ln kobs相对于1/T的线性回归分析得到的拟合参数:

[0372]

配制物	斜率	截距	R^2

配制物1	-13840.4	36.00	1
配制物2	-12079.6	30.10	1
配制物3	-8823.9	20.06	1
配制物4	-9042.6	20.53	1
配制物5	-11853.4	29.18	1

[0373] 根据方程1的阿伦尼乌斯关系，接着使用所述数据计算5℃下每种媒剂的ln kobs，计算了$t_{95\%}$，其对应于直至抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体纯度将接近总样品组成的95％的培育天数(表30)。在5℃下储存时，所有配制物的溶液稳定性计算为大约>4600天(或大约>12年)。

[0374] 表30:VH14_1G.VL15的近似降解率和在5℃下储存的$t_{95\%}$。

[0375]

配制物	*ln kobs*	*kobs*	$T_{95\%}$，获得95%样品纯度的天数	84天时观察到的纯度%
配制物 1 10 mM 组氨酸、110 mM 精氨酸、1.5%山梨醇、0.01% (w/v) PS20，pH 6.0，20 mg/mL	-13.75	1.06×10^{-6}	37405	98.9
配制物 2	-13.33	1.63×10^{-6}	24463	98.9

[0376]

10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3% 山梨醇、0.01% (w/v) PS20，pH 6.3，20 mg/mL				
配制物 3 10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3% 山梨醇、0.01% (w/v) PS20，pH 6.5，50 mg/mL	-11.66	8.64×10^{-6}	4605	98.8
配制物 4 10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3% 山梨醇、0.01% (w/v) PS20，pH 6.5，20 mg/mL	-11.98	6.28×10^{-6}	6337	98.8
配制物 5 10 mM 组氨酸、55 mM 精氨酸、55 mM 谷氨酸、3% 山梨醇、0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20 mg/mL	-13.43	1.47×10^{-6}	27122	98.8

[0377] 实施例14

[0378] 使用相同的方法，可使用收集的CE-HPLC数据估计达到原始值的95％的样品纯度。对于每个测试条件，使用CECHPLC分析中发现的抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体纯度百分比值绘制ln纯度相对于时间的图。使用图20-22的数据生成的直线表示伪一级降解动力学，至少对于45℃和25℃测试样品，其中斜率与降解速率常数(-kobs)相关(表31)。

[0379] 表31:媒剂和温度对kobs的依赖性：

[0380]

	45℃		25℃		5℃	
	k*obs*	R^2	k*obs*	R^2	k*obs*	R^2
配制物 1	1.23E-02	0.99754	1.82E-03	0.98238	1.19×10^{-5}	0.00504
配制物 2	1.31E-02	0.99874	2.06E-03	0.98201	3.01×10^{-5}	0.02379
配制物 3	1.35E-02	0.99855	1.76E-03	0.99138	7.71×10^{-5}	0.19475
配制物 4	1.46E-02	0.98871	2.66E-03	0.97620	7.62×10^{-5}	0.17237
配制物 5	1.53E-02	0.99947	2.53E-03	0.97648	1.35×10^{-4}	0.27511

[0381] 使用此数据，为每种配制物在三种稳定温度下生成了阿伦尼乌斯图(ln kobs相对于1/T)(图23)。从此分析中，获得的线拟合参数表明数据内具有良好相关性，即R^2值≥0.95。ln kobs与1/T的良好线性拟合表明在测试的温度范围内运行的分解机制类似(表32)。此外，这意味着分解遵循阿伦尼乌斯行为。

[0382] 表32：每种配制物的ln kobs相对于1/T的线性回归分析得到的拟合参数：

[0383]

配制物	斜率	截距	R^2
配制物1	-15484.4	44.74	0.9542
配制物2	-13540.5	38.57	0.9666
配制物3	-11471.0	31.89	0.9932
配制物4	-11701.0	32.82	0.9740
配制物5	-10510.4	29.00	0.9902

[0384] 根据阿伦尼乌斯关系，其中斜率＝-Ea/R且截距＝ln A，接着使用表32的数据计算每种媒剂在5℃下的ln kobs。此外，根据5℃下的kobs并使用一级动力学速率方程的线性形式，其中k是观察到的速率常数(kobs)，并且纯度$_0$和纯度$_t$分别是时间0和t的纯度，计算了$t_{95\%}$，它对应于直至抗体纯度将接近原始样品纯度的95％的培育天数(表33)。经计算，在pH 6.3下配制物中的抗体稳定性为大约>1200天(或大约>3年)，且在pH 6.0下甚至更长。

[0385] 表33：近似降解率和在5℃下储存的$t_{95\%}$：

[0386]

配制物	*ln kobs*	*kobs*	$t_{95\%}$，获得95%原始样品纯度的天数	84天时观察到的纯度%
配制物 1 10 mM组氨酸、110 mM精氨酸、1.5%山梨醇、0.01% (w/v) PS20，pH 6.0 20 mg/mL	-10.93	1.80×10^{-5}	2855	63.5
配制物 2 10 mM组氨酸、75 mM精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v)	-10.11	4.08×10^{-5}	1256	63.2

[0387]

PS20，pH 6.3 20 mg/mL				
配制物 3 10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 50 mg/mL	-9.35	8.66×10^{-5}	593	63.1
配制物 4 10 mM 组氨酸、75 mM 精氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20 mg/mL	-9.25	9.62×10^{-5}	533	63.1
配制物 5 10 mM 组氨酸、55 mM 精氨酸、55 mM 谷氨酸、3%山梨醇、0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20 mg/mL	-8.79	1.53×10^{-4}	335	63.2

[0388] 在所有测试抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体配制物中获得了20mg/mL或50mg/mL的目标浓度，从而在整个研究期间产生透明、无色和无微粒的配制物。在-70℃和2-8℃下储存12周、冷冻/解冻或2-8℃摇动应力条件后，在任何测试配制物之间均未观察到单体或带电物种的显著变化，因为所得数据与t＝0结果相当并且在分析可变性内。25℃和45℃培育后的浊度值表明，精氨酸和山梨醇的配制物在pH 6.3下的稳定性最高。如通过SE-HPLC所测定，与pH 6.0相比，在pH 6.3至6.5范围内配制的样品中保持了更高的VH14_1G.VL15稳定性，这仅在45℃测试条件下才能清楚地观察到。与50mg/mL抗APRIL(VH14_1G.VL15)抗体的相同配制物相比，在20mg/mL蛋白质浓度下观察到更高的稳定性。在25℃和45℃下培育后，对带电物种的CE-HPLC评估揭示了对所有带电物种的变化较小的pH为6.0或pH 6.3的配制物的偏好。基于使用阿伦尼乌斯关系计算的降解速率，10mM组氨酸、75mM精氨酸、3％山梨醇、0.01％(w/v)PS20，pH 6.3配制物的预测单体和带电物种稳定性在5℃下为大约至少三年。

[0389] 实施例15

[0390] 在一项临床研究(参见PCT/IB2020/000020)中，患有多发性骨髓瘤的受试者接受了剂量为每周一次至多1350mg IV或每2周一次给予的至多2700mg IV的抗APRIL抗体BION-1301(本文中也称为VH14_1G.VL15)。BION-1301在50至2700mg的剂量下以剂量依赖性方式抑制APRIL的血清水平。在450mg时，在峰值暴露水平附近实现了95％目标参与(TE)；在1350mg时，在整个给药间隔期间维持95％TE。暴露在评估的剂量范围内近似呈剂量线性，抗药物抗体的发生率较低。总体而言，抗体耐受性良好，未报告剂量限制性毒性，并且未确定最大耐受剂量。一名患者在50mg剂量下报告了单一严重不良反应(SAR)(喘息)并导致治疗中止。

[0391] 以下是在接受至多1350mg IV单剂量和至多450mg IV多剂量的BION-1301的志愿者中进行的1期研究，以评估静脉内施用的BION-1301的安全性、耐受性、PK和PD。所述研究已在HV中开始，并且也将在IgAN成人中进行。此研究设计包括研究方案中描绘的3个部分

(图24)。BION-1301作为用于静脉内(IV)施用的溶液提供。BION-1301将被稀释并通过IV输注在大约2小时内以指定的剂量水平施用。BION-1301在小瓶中以20mg/mL供应于至少5mL的溶液中,所述溶液将在输注前用0.9%盐水溶液稀释。例如,特定剂量所需的小瓶数确定为所需体积=mg剂量/20mg/mL,并将此体积除以5mL/小瓶以确定所需小瓶的总数。如果使用250mL 0.9%盐水袋进行稀释,则在添加抗体溶液之前,将从盐水袋中取出与给药所需的抗体溶液量相等的体积。从每个小瓶(单次使用小瓶,每个小瓶使用新注射器)中取出所需量的抗体溶液并添加至盐水袋中。对于第3部分:在初始剂量后,后续剂量的输注时间可减少至1小时,前提是研究人员评估没有耐受性问题。安慰剂是拟用于IV施用的0.9%生理盐水溶液。安慰剂将在大约2小时内通过IV输注施用(仅适用于第1部分和第2部分)。

[0392] 表34:用于IV施用的BION-1301配制物。

[0393]

	BION-1301	**安慰剂**
剂量配制物	输注溶液浓缩物 20 mg/mL 于 10 mM L-组氨酸、75 mM L-精氨酸、3%山梨醇和 0.01% (w/w)聚山梨醇酯 20, pH 6.3 中。	输注溶液
单位剂量	10 mg、50 mg、150 mg、450 mg、1350 mg	0.9%生理盐水
强度/浓度	20 mg/mL, 其将根据药学手册(如上所述)在施用前用 0.9%生理盐水稀释	NA
施用途径	IV 输注	IV 输注

[0394] IV=静脉内;NA=不适用;SAD-HV=健康志愿者的单次递增剂量

	目标	指标
	主要	
	● 表征BION-1301在健康志愿者(HV)和IgAN患者中的安全性和耐受性	● 治疗中出现的不良事件(TEAE)、治疗中出现的严重不良事件(SAE)的发生率和严重程度，以及安全参数相对于基线的变化
	次要	
	● 表征单剂量和/或多剂量后通过IV输注或SC注射施用的BION-1301的药物动力学(PK)	● 血清浓度-时间曲线和非隔室PK参数
	● 评估单剂量和多剂量后BION-1301的免疫原性	● 抗药物抗体(ADA)和中和抗体(NAb)的发生率
[0395]	● 表征单剂量和多剂量后BION-1301对免疫球蛋白的药效学(PD)影响	● 免疫球蛋白水平(IgA、IgG、IgM)相对于基线的变化
	● 评估IgAN患者的蛋白尿和肾功能的变化	● 基于24小时尿液收集的尿蛋白/肌酸比(UPCR)和尿蛋白排泄相对于基线的变化。
	探索性	
	● 评估BION-1301的最佳剂量和时间表，以在IgAN患者中实现具有临床意义的目标效应。	● BION-1301的最佳剂量和时间表将基于所有可用的PK、PD、生物标志物和初步功效数据进行评估。
	● 评估IgAN患者的肾功能的变化	● 以下各者相对于基线的变化: ○ 基于24小时尿液收集的尿白蛋白/肌酐比(UACR)和尿白蛋白排泄 ○ 估计肾小球滤过率(eGFR)
	● 评估DNA变异性与安全性、耐受性和/或功效的关系	● DNA变异性(如单核苷酸多态性[SNP])的相关性以及其与安全性、耐受性和/或功效的关系(如果有指征)
[0396]	● 表征单剂量和多剂量后BION-1301 活性的选定生物标志物	● 以下各者相对于基线的变化: ○ APRIL水平 ○ 可行时，半乳糖缺陷型(gd)-IgA1和抗gd-IgA1抗体 ○ 其它探索性生物标志物变量

[0397] 第1部分(SAD-HV)是HV中的双盲、随机、安慰剂对照单次递增剂量(SAD)设计。最多可评估5个剂量群组;剂量水平为10mg、50mg、150mg、450mg和1350mg。每个群组中的HV以3:1

的比例随机分组，分别接受BION-1301或安慰剂。在每个群组中使用前哨给药，以确认是否存在任何需要停止群组中剩余HV的给药的安全问题。

[0398] 第2部分(MAD-HV)是在HV中进行的双盲、随机、安慰剂对照多次递增剂量(MAD)设计。每个群组中的HV以2:1的比例随机分组，分别接受BION-1301或安慰剂。每个HV接受每2周一次(Q2W)通过IV输注施用的BION-1301或安慰剂，共3剂(即第1天、第15天和第29天)。最多可评估四个剂量群组；预期的每剂量水平为50mg、150mg、450mg和1350mg。

[0399] 在第1部分和第2部分中，如果满足以下任何标准，则停止剂量递增：

[0400] 群组中的一名或多名受试者出现由研究人员评估为与BION-1301相关的SAE；

[0401] 群组中的两名或更多名受试者经历由研究人员评估为与BION-1301相关的重度非严重AE(根据美国国家癌症研究所不良事件通用术语标准[NCI-CTCAE]5.0版为≥3级)；

[0402] 接受研究药物的群组中的两名或更多名受试者出现同一器官类别中的相似临床显著实验室、ECG或生命体征异常，表明剂量限制不耐受；

[0403] 超过在食蟹猴中确定为NOAEL的平均AUC(24,000μg*天/mL)或平均C最大(5720μg/mL)的个体AUC(0-168h)和/或C最大；或

[0404] 同一群组中的两名或更多名受试者的IgG水平持续低于1.5g/L，或低于3.0g/L并出现细菌感染迹象。

[0405] 第3部分(MD-IgAN)是针对IgAN成人受试者正在进行的开放标签多剂量设计。MD-IgAN将在安全审查小组(SRT)评估最后一个MAD-HV群组后启动。第3部分将由至少2个群组组成，如果探索了替代剂量或给药时间表，则可选择添加其它群组。给药群组1、2和后续群组(如果适用)的总持续时间为至多2年。群组1的样本量将为大约10名IgAN患者。对于群组2和添加的任何其它群组，样本量总共不会超过大约40名IgAN患者。

[0406] 第一群组将接受450mg剂量水平的BION-1301，其将每2周通过IV输注给予至多1年。第二群组将在SRT推荐和审查MD-IgAN群组1中至少5名受试者的可用数据，证明有足够的安全性和耐受性后开始登记。当SRT建议启动群组2时，所有患者都将通过SC注射接受BION-1301(在10mM L-组氨酸、75mM L-精氨酸、3％山梨醇和0.01％(w/w)聚山梨醇酯20，pH 6.3中以150mg/mL配制)至多1年。MD-IgAN群组2的剂量和给药方案的选择将基于所有先前受试者，包括来自MD-IgAN群组1的受试者的所有可用安全性、PK和PD数据。如果SRT建议更改即将到来的受试者的剂量或时间表，则将形成一个新的群组。除了群组1和2之外，还可探索一个或多个其它群组。第3部分中BION-1301的最大剂量将不超过1350mg，并且BION-1301在给药间隔内的最大暴露量将不超过在多发性骨髓瘤患者(ADU-CL-16;NCT03340883)中进行的1期剂量递增试验中观察到的量。对于通过SC注射接受BION-1301的受试者，剂量将不超过600mg QW。所有通过IV输注接受BION-1301的患者都需要在IV给药至少24周后过渡到SC施用途径。可修改从IV转为SC的患者的剂量或时间表，以考虑施用途径之间的生物利用度差异，并将由SRT与申办者基于所有可用数据共同确定。

[0407] 在第3部分中的剂量递增的情况下，如果群组中的两个或更多个受试者经历药物相关毒性或TEAE，其在SRT看来，鉴于可能被视为研究群体可接受风险的风险将阻止受试者的进一步给药，则剂量递增将停止。

[0408] 纳入标准：健康志愿者

[0409] 1.筛选时年龄为18至55岁(包括端点)的健康男性或女性志愿者

[0410] 2.女性必须不具有生育能力(根据CTFG 2014)

[0411] 3.男性必须同意遵守方案规定的避孕指南

[0412] 4.在至少50kg的体重下,筛选时身体质量指数(BMI)为18至35kg/m^2(包括端点)

[0413] 5.非吸烟者,定义为之前不吸烟和/或在筛选访视前至少3个月已停止吸烟或使用尼古丁/含尼古丁产品(包括鼻烟、电子烟和类似产品)的个人,经病史证实

[0414] 6.健康状况良好,由病史、体格检查、生命体征评估、12导联心电图(ECG)和临床实验室评估在正常参考范围内(或在研究人员认为与临床无关的正常参考范围之外)确定

[0415] 7.筛选时总IgG>10g/L

[0416] 8.能够提供签署的知情同意书,包括遵守知情同意书(ICF)中列出的要求和限制

[0417] 排除标准:健康的志愿者

[0418] 符合以下任何排除标准的健康志愿者将没有资格参加:

[0419] 1.已知或疑似对BION-1301的任何成分过敏或有超敏反应,或对任何单克隆抗体有严重超敏反应史

[0420] 2.筛选之前6个月内经常饮酒(女性>7杯/周,男性>14杯/周,其中1杯=5盎司[150mL]葡萄酒或

[0421] 12盎司[360mL]啤酒或1.5盎司[45mL]烈酒),或在筛选访视之前3个月内使用软性药物(例如大麻),或在筛选访视之前1年内使用硬性药物(例如可卡因和苯环利定)和/或在筛选访视或入院时滥用药物或酒精的血液或尿液测试结果呈阳性

[0422] 3.在第一剂研究药物之前3个月内捐献血液,在第一剂研究药物之前7天内捐献血浆,或在第一剂研究药物之前6周内捐献血小板

[0423] 4.在第一剂研究药物之前7天直至最后一次随访,不能放弃剧烈运动

[0424] 5.在第一剂研究药物后的28天或5个半衰期(以较长者为准)内使用任何非处方的全身或局部药物治疗、药物或补充剂、任何处方的全身或局部药物治疗(不包括每天最多2g的扑热息痛或每天最多800mg的布洛芬或激素替代疗法[HRT])

[0425] 6.根据研究人员的判断,用于多次抽血和研究药物施用的静脉通路不良

[0426] 7.在本研究的第一剂研究药物后的28天或5个半衰期(以较长者为准)内参与任何其它研究,在其中收到研究性新药或研究性装置

[0427] 8.在本研究的第一剂研究药物之前的28天或5个半衰期(以较长者为准)内接受批准的单克隆抗体药物

[0428] 9.第1天之前的6个月内的任何确认或疑似免疫抑制或免疫缺陷状态,包括人类免疫缺陷病毒(HIV)感染或无脾;复发性、严重感染和慢性免疫抑制剂药物治疗(吸入/局部皮质类固醇超过28天,且全身性免疫抑制或皮质类固醇疗法超过1周)

[0429] 10.筛选时甲型肝炎病毒IgM抗体(抗HAV IgM)、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎病毒(HCV)抗体或HIV-1和/或HIV-2抗体的血清学测试呈阳性

[0430] 11.在第一剂研究药物之前28天内发生的大手术或严重外伤。如果大手术发生在第一剂研究药物之前>28天,则个体必须在第一剂研究药物之前从干预所致的任何毒性和/或并发症中充分恢复。

[0431] 12.可能对受试者安全构成风险或干扰研究,或会使受试者不适合参与的临床显著病症、病况或疾病的历史或证据,例如呼吸系统、肾脏、肝脏、胃肠道、血液、淋巴、神经、心

血管或精神疾病

[0432] 13.筛选时QuantiFERON-TB Gold Plus测试呈阳性

[0433] 14.在筛选前3个月内接受过活疫苗接种或计划在最后一剂研究药物后3个月内接受活疫苗接种

[0434] 15.母乳喂养或筛选时血清妊娠测试呈阳性或第-1天尿液妊娠测试呈阳性的女性

[0435] 16.研究人员或医学监察员认为使参与者不适合纳入或可能干扰参与者完成研究的能力的任何其它情况

[0436] IgAN患者的纳入标准

[0437] 有资格参加的个体必须满足以下所有标准：

[0438] 1.筛选时男性或女性≥18岁

[0439] 2.有生育能力的女性(WOCBP;根据CTFG 2014)必须同意在整个研究期间(从筛选到最后一剂研究药物后的大约5个半衰期(165天))遵守方案规定的避孕指南

[0440] 3.男性必须同意在整个研究期间(从筛选到最后一剂研究药物后的大约5个半衰期(165天))遵守方案规定的避孕指南

[0441] 4.在至少50kg的体重下,筛选时BMI为18至40kg/m^2(包括端点)

[0442] 5.被认为有资格参加此研究,由病史、体格检查、生命体征评估、12导联ECG和临床实验室评估在正常参考范围内或与IgAN一致(或如果在正常参考范围之外,研究人员认为与临床无关)确定

[0443] 6.由过去10年内进行的活检证实的IgAN诊断

[0444] 7.基于对筛选时收集的24小时尿液的评估,尿蛋白≥0.5g/24h;或UPCR≥0.5g/g(或≥50mg/mmol)。

[0445] 8.eGFR(根据慢性肾脏病流行病学协作[CKD-EPI]公式)或测量的GFR>45mL/min/1.73m^2;或者如果在第1天前的2年内进行的肾活检未提供肾小球纤维化的证据(例如,根据牛津分类的S1),则为30-45mL/min/1.73m^2。

[0446] 9.在筛选前至少3个月稳定服用优化剂量的血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂和/或血管紧张素受体阻滞剂(ARB)或对ACE/ARB不耐受。

[0447] 10.能够提供签署的知情同意书,包括遵守ICF中列出的要求和限制

[0448] 11.筛选访视时血压<140/90mmHg(收缩压/舒张压)

[0449] IgAN患者的排除标准

[0450] 符合以下任何排除标准的个体将没有资格参加：

[0451] 1.已知或疑似对BION-1301的任何成分过敏或有超敏反应,或对任何单克隆抗体有严重超敏反应史

[0452] 2.在第一剂研究药物之前3个月内捐献血液;在第一剂研究药物之前7天内捐献血浆;或在第一剂研究药物之前6周内捐献血小板

[0453] 3.根据研究人员的判断,用于多次抽血和研究药物施用的静脉通路不良

[0454] 4.在本研究的第一剂研究药物后的28天或5个半衰期(以较长者为准)内参与任何其它研究,在其中收到研究性新药或研究性装置

[0455] 5.第1天之前的3个月内的任何确认或疑似免疫抑制或免疫缺陷状态,包括HIV感染或无脾;复发性、严重感染和慢性免疫抑制剂药物治疗(吸入/局部皮质类固醇超过28天,

且全身性免疫抑制或皮质类固醇疗法超过1周)

[0456] 6.筛选时抗HAV IgM、HBsAg、HCV抗体(除非针对HCV进行了充分治疗)或HIV-1和/或HIV-2抗体的血清学测试呈阳性

[0457] 7.在第一剂研究药物之前28天内发生的大手术或严重外伤。如果大手术发生在第一剂研究药物之前>28天,则个体必须在第一剂研究药物之前从干预所致的毒性和/或并发症中充分恢复

[0458] 8.根据研究人员的判断,可能对受试者安全构成风险或干扰研究,或将使受试者不适合参与的临床显著病症、病况、疾病或实验室发现的历史或证据

[0459] 9.在本研究的第一剂研究药物之前的28天或5个半衰期(以较长者为准)内先前使用过任何经批准的生物制剂,包括单克隆抗体

[0460] 10.由治疗医生定义的继发性IgAN形式(例如IgA血管炎和伴有酒精性肝硬化的那些)

[0461] 11.临床怀疑快速进展性肾小球肾炎(RPGN)。

[0462] 12.研究人员认为需要立即治疗的任何肾脏表现,包括在研究期间需要透析治疗或任何计划的肾移植

[0463] 13.在第一剂研究药物之前3个月内接受过全身性皮质类固醇疗法(>10mg/天的泼尼松或等效药物至少10天)或任何其它形式的免疫抑制疗法

[0464] 14.1型或2型糖尿病

[0465] 15.研究人员判断的不受控制的心血管疾病

[0466] 16.当前的恶性肿瘤或过去3年内的恶性肿瘤病史;例外情况包括

[0467] • 充分治疗的基底细胞癌

[0468] • 皮肤鳞状细胞癌或原位宫颈癌

[0469] • 低风险前列腺癌(即Gleason评分<7和前列腺特异性抗原<10ng/mL)

[0470] 17.危及生命或具有临床意义以使得可能会限制对研究要求的遵守,或在研究人员的评估中会使受试者处于不可接受的研究参与风险下的并发疾病(包括活动性感染)

[0471] 18.筛选时QuantiFERON-TB Gold Plus测试呈阳性

[0472] 19.在筛选前3个月内至最后一剂研究药物后3个月内接受过活疫苗接种。非复制型病毒载体疫苗是可接受的。

[0473] 20.母乳喂养或筛选时血清妊娠测试呈阳性或第1天给药前尿液妊娠测试呈阳性的女性

[0474] BION-1301的药理学活性剂量(PAD)定义为预计会在24小时的最大持续时间内导致游离血清APRIL浓度降低95%,且免疫球蛋白降低最小(IgG约6%,IgA约15%)的单剂量。根据食蟹猴单剂量和多剂量毒理学研究数据的PK-PD建模,估计的PAD为50mg。所述模型解释了食蟹猴与人类之间APRIL浓度的差异,并应用异速生长标度来转换物种之间的速率常数(PK和PD)和体积(PK)。

[0475] 将安全系数5应用于PAD以说明临床研究(ADU-CL-16)中多发性骨髓瘤患者尚未发现的潜在毒性,并说明HV与患者之间的风险收益概况不同的事实。在当前研究的第1部分中,第一群组从10mg开始,且由4个HV组成:3个接受BION-1301,一个接受安慰剂(相对于后续群组中6个接受BION-1301,2个接受安慰剂)。SAD-HV-1的HV数量减少是基于对免疫球蛋

白浓度的预期轻微药理效应的假设;因此,此数据对于表征BION-1301的剂量-暴露-效应关系的效用有限。

[0476] 除了上述基于PAD的考虑因素外,10mg的起始剂量比食蟹猴中100mg/kg的未观察到不良反应水平(NOAEL)低600至2383倍。因此,存在足够的安全系数来支持健康成人中BION-1301的此初始剂量。

[0477] 表35:健康志愿者起始剂量的安全系数

[0478]

1期起始剂量[a]	剂量安全系数[b]	AUC安全系数[c]	C最大安全系数[d]
10 mg (0.17 mg/kg)	600	1429	2383

[0479] AUC=浓度-时间曲线下面积;C最大=最大血清浓度;SF=安全系数

[0480] [a]假设60kg人类,人类10mg剂量相当于0.17mg/kg。

[0481] [b] SF剂量=剂量食蟹猴/剂量人类

[0482] [c] SFAUC=AUC食蟹猴/AUC人类。在研究的第29天,100mg/kg的性别组合AUC0-168食蟹猴为24,000mg*天/L。在接受50mg的多发性骨髓瘤受试者中观察到的AUC0-inf为84mg*天/L(582nM.天);假设线性PK,这将使得10mg剂量下的AUC0-inf为16.8mg*天/L。

[0483] [d] SFC最大=(C最大-食蟹猴)/(C最大-人类),其中100mg/kg的C最大-食蟹猴基于第29天的5个剂量后观察到的平均C最大-观察。食蟹猴在第29天的性别组合C最大为5720μg/mL。在50mg下在人体中观察到的C最大为

[0484] 12mg/L(85.0nM);假设线性PK,这将导致10mg剂量下的C最大为2.4mg/L。

[0485] 进行了第1部分和第2部分,且第1部分(SAD)和第2部分(MAD)中的基线人口统计数据如下表36中所示:

[0486] 表36:第1部分和第2部分的基线人口统计数据。

[0487]

组	SAD抗APRIL	SAD安慰剂	MAD抗APRIL	MAD安慰剂
N	27	9	18	9
平均年龄(岁) (SD)	36.66 (8.38)	35.0 (8.39)	35.4 (9.01)	36.55 (7.85)
男性	27 (100%)	9 (100%)	18 (100%)	9 (100%)
女性	0	0	0	0
亚裔	2 (7.4%)	3 (33.3%)	0	0
黑人/非裔美国人	6 (22.2%)	1 (11.1%)	3 (16.7%)	2 (22.2%)
白人	18 (66.7%)	4 (44.4%)	11 (61.1%)	4 (44.4%)
多种族	1 (16.7%)	1 (11.1%)	4 (22.2%)	3 (33.3%)
平均BMI (kg/m2) (SD)	25.46 (2.47)	23.73 (2.94)	25.65 (3.00)	25.95 (1.56)

[0488] BION-1301在HV中具有良好耐受性。没有报告SAE、治疗中断或符合停止标准的事件。所有患者在第一次输注前接受了预先用药,并且在MAD 150mg群组中报告了1例输注相关反应。在MAD群组中,≥10%的受试者中出现的最常见AE是头痛、四肢疼痛、AST升高和鼻咽炎。在SAD群组中,≥10%的受试者中出现的最常见AE是鼻咽炎。给药与抗药物抗体和中

和抗体的低发生率相关。

[0489] 图25显示了指定剂量下的平均BION-1301血清浓度(+/-SD)相对于标称时间。群组中的浓度相似,个体差异可能是固定剂量和可变体重影响药物处置的结果。平均BION-1301血清浓度在低剂量时通常与剂量成比例,但在较高剂量时略高于与剂量成比例。

[0490] 图26显示了指定剂量下的平均游离APRIL(fAPRIL)血清浓度+/-SD相对于标称时间。如图所示,BION-1301显示出目标占用率的持久剂量依赖性增加,在较高剂量下持续超过一个月。

[0491] 图27显示了血清中免疫球蛋白水平相对于给药前第1天采集的基线样品的平均百分比变化(+/-SD)。图A-C显示随时间(天)相对于基线的单剂量群组,且图D-F显示多剂量群组。BION-1301剂量依赖性且持久地减少IgA和IgM,并在较小程度上减少IgG。此数据与患者每月给药的可能性一致。在1350mg单剂量或450mg多剂量水平下,BION-1301将IgM水平抑制到低实验室值范围内,但没有与治疗相关的感染报告。BION-1301介导的免疫球蛋白减少有可能破坏IgA:IgG免疫复合物的化学计量。如图28A和B中所示,BION-1301提供了一个药效学窗口来利用IgA减少,同时缓和对IgG的影响。

[0492] 图33显示在健康人类志愿者中通过静脉内(IV)输注施用BION-1301的单次递增剂量(SAD)和多次递增剂量(MAD)研究中,血清IgA和Gd-IgA1的减少。如图所示,BION-1301提供了血清IgA和Gd-IgA1水平的剂量依赖性比例降低。

[0493] 根据第3部分的初步数据,5名患者已通过IV输注在12周内以Q2W给予450mg BION-1301。治疗耐受性良好,没有因SAE的不良事件而提前终止。观察到快速和持续的游离APRIL减少,Gd-IgA1、IgA和IgM的持久减少,以及较小的IgG减少。观察到有临床意义的蛋白尿减少(24小时UPCR)。初步数据显示了BION-1301耗竭致病性Gd-IgA1并减少IgA肾病患者的蛋白尿的病情改善潜力的早期概念验证,尽管优化了SOC治疗,但所述患者仍有残留蛋白尿的进展风险。

[0494] 作为循环中含有致病性IgA的免疫复合物的存在的替代物,使用离体系膜细胞活化分析作为生物分析。在基线、BION-1301施用之前以及BION-1301治疗的第29天和第85天,通过柱色谱从招入研究的前两名IgAN患者的血浆中分离IgA级分。接着用这些源自患者的含有IgA的级分刺激培养中的原代人系膜细胞72小时,并通过Brdu掺入一式三份地测量系膜细胞增殖。如图34中所示,BION-1301使得APRIL快速中和,然后使得Gd-IgA1耗竭且系膜细胞活化减少,且随后使得这些IgAN患者的蛋白尿减少。

[0495] 实施例16

[0496] 以下是对成年健康志愿者静脉内(IV)或皮下(SC)施用的BION-1301的1期单剂量、平行组安全性和生物利用度研究。进行此研究旨在确定BION-1301在作为SC注射剂施用时的生物利用度,以帮助确定推荐的2期剂量(RP2D),所述剂量将使SC慢性给药能够用于IgAN治疗的建议适应症。

[0497]

剂量配制物	用于肠胃外施用的无菌溶液
外观	玻璃瓶中的液体
强度/浓度	对于 IV 施用：20 mg/mL 于 10 mM L-组氨酸、75 mM L-精氨酸、3%山梨醇和 0.01% (w/w)聚山梨醇酯 20，pH 6.3 中。(施用前用 0.9%生理盐水稀释) 对于 SC 施用：150 mg/mL 于 10 mM L-组氨酸、75 mM L-精氨酸、3%山梨醇和 0.01% (w/w)聚山梨醇酯 20，pH 6.3 中。
剂量水平	300 mg 单次给药
施用途径	IV 输注或 SC 注射

[0498]

目标	**指标**
主要	
● 估计在成年健康志愿者中与 IV 途径相比，通过 SC 途径作为单剂量施用的 BION-1301 的生物利用度	● BION-1301 的皮下生物利用度，基于相对 AUC0-inf 和 AUC0-t 计算
次要	
● 评估 BION-1301 在成年健康志愿者中的安全性和耐受性	● 治疗中出现的不良事件(TEAE)、严重不良事件(SAE)的发生率和严重程度，以及安全性参数相对于基线的变化
● 描述在成年健康志愿者中通过 IV 和 SC 途径以 300 mg 的单剂量施用的 BION-1301 的药物动力学(PK)	BION-1301 通过 IV 和 SC 途径施用时的药物动力学(PK)，通过 C0、C 最大、T 最大、AUC0-inf、AUC0-t、C 最小、t½、CL 和 Vss 评估。
● 评估在成年健康志愿者中通过 IV 和 SC 途径以 300 mg 的单剂量施用的 BION-1301 的药效学(PD)	● 通过 IV 和 SC 途径施用时 BION-1301 的药效学(PD)，通过 IgM、IgG 和 IgA 的变化评估
● 评估在成年健康志愿者中通过 IV 和 SC 途径以 300 mg 的单剂量施用的 BION-1301 的免疫原性	● 通过 IV 和 SC 途径施用时 BION-1301 抗药物抗体的发生率
第三/探索性	
● 表征 BION-1301 活性的选定生物标志物	● 以下各者相对于基线的变化: ○ 游离增殖诱导配体(APRIL)水平

[0499]

[0500] 所述研究是通过IV和SC途径对成年健康志愿者施用的BION-1301的I期、开放标签、随机、单剂量、平行组安全性和生物利用度研究。所述研究招募了至多大约34名受试者(每组17名)，以在双组、平行组、3期设计中实现总共30名PK可评估受试者。受试者以1:1的比例随机分至接受IV施用的BION-1301(治疗组A)或SC施用的BION-1301(治疗组B)。在两个治疗组中，受试者均将接受300mg单剂量的BION-1301。研究在3个确定的研究期进行：筛选期、治疗期和安全随访期。在进行任何与研究相关的程序或评估之前，获得了参与研究的书面知情同意书。第1天在合格人员的监督下在诊所进行给药(SC或IV)。在第1天给药后的前

24小时和呆在诊所直至第8天期间密切监测受试者。一旦最后一名受试者在第57天完成最后一次访视，研究便得以完成。任何个体受试者的研究持续时间为至多14周，包括6周的筛选期和8周的治疗(1天)和安全随访期。受试者通过2种施用途径(IV或SC)中的1种接受单次300mg剂量的BION-1301。如实施例15中所述地制备IV剂量，其中将20mg/mL抗体配制物稀释至0.9％盐水中，在此情况下，使用3×5mL小瓶提供稀释至235mL盐水溶液中的15mL抗体溶液。SC剂量以150mg/mL配制物的小瓶形式提供，并用注射器取出所需的2.0mL体积并直接注射至腹部。

[0501] 筛选期：从签署知情同意书(ICF)时开始。在此期间，受试者接受评估以确定参与研究的资格。筛选期持续时间长达6周。符合所有资格标准的受试者被招入研究。

[0502] 入院/治疗期：从第-1天入院开始且在第8天出院结束。第1天在合格人员的监督下在诊所进行给药(SC或IV)。在第1天给药后的前24小时内对受试者进行密集监测，且接着密切监测直至第8天出院。在治疗期间，对受试者进行PK和PD的安全监测和评估。在第8天完成最终PK和PD样品收集和安全性评估后，受试者进入随访期。

[0503] 随访期：从出院时开始且在第57天以SOE中所述的研究结束(EOS)访视结束。

[0504] 有资格被纳入研究的参与者符合以下所有标准：

[0505] 参与者在签署知情同意书时必须为18-60岁。

[0506] 1)在≥47kg的体重下，筛选时身体质量指数(BMI)为18-30kg/m^2(包括端点)

[0507] 2)非吸烟者，定义为之前不吸烟和/或在筛选访视前至少3个月已停止吸烟或使用尼古丁/含尼古丁产品(包括但不限于鼻烟、电子烟和类似产品)的个人，经病史和阴性可替宁水平证实

[0508] 3)健康状况良好，由研究人员基于病史、体格检查(PE)、生命体征评估、12导联ECG和临床实验室评估在正常参考范围内(或在研究者认为不具有临床意义的正常参考范围之外)确定。

[0509] 4)研究人员认为在受试者参与研究期间可能遵守方案。

[0510] 5)目前未服用处方药或非处方药，包括膳食补充剂，除非研究人员和申办者/医学监察员认为合适。

[0511] 6)参与者可为男性或女性。

[0512] 男性参与者有资格参与的条件是他们同意在筛选至最后一剂研究药物后的10周内遵守避孕指南：

[0513] •输精管结扎术后>3个月，或者

[0514] •在筛选至最后一剂研究药物后的10周内避免捐献精子

[0515] 加上：

[0516] •避免异性性交

[0517] 或者

[0518] •同意在性交时将男用避孕套与另一种高效的女性屏障避孕方法结合使用。

[0519] 女性参与者有资格参与的条件是他们同意在筛选至最后一剂研究药物后的10周内遵守避孕指南：

[0520] •不是有生育能力的女性(WOCBP)，或者

[0521] •是WOCBP并使用从筛选到最后一剂研究治疗之后10周都非常有效的避孕方法，

并同意在此期间不捐赠卵子(卵细胞、卵母细胞)用于生殖目的。如果高效的避孕方法是激素,则他们的男性伴侣也必须使用屏障方法(即男用避孕套)。研究人员应评估与开始研究治疗相关的避孕方法的有效性。

[0522] • WOCBP必须在研究治疗剂量之前的24小时内具有呈阴性的高度敏感妊娠测试(当地法规要求的血清)。

[0523] 7)能够给出并理解签署的知情同意书,并愿意参与研究。

[0524] 如果满足以下任何标准,参与者将被排除在研究之外:

[0525] 1)筛选之前6个月内经常饮酒(女性>7杯/周,男性>14杯/周,其中1杯=5盎司[150mL]葡萄酒或12盎司[360mL]啤酒或1.5盎司[45mL]烈酒),或在筛选访视之前3个月内使用软性药物(例如大麻),或在筛选访视之前1年内使用硬性药物(例如可卡因和苯环利定)和/或在筛选访视时滥用药物或酒精的血液或尿液测试结果呈阳性。

[0526] 2)在单剂研究药物之前3个月内捐献血液,在单剂研究药物之前7天内捐献血浆,或在单剂研究药物之前6周内捐献血小板,或在单剂研究药物后的8周内接受过血液或血液制品。

[0527] 3)在研究药物施用后的28天或5个半衰期(以较长者为准)内使用任何处方药、非处方的全身或局部药物治疗、药物或补充剂、任何处方的全身或局部药物治疗(不包括每天最多2g的扑热息痛或每天最多800mg的布洛芬、激素替代疗法[HRT]或激素避孕药),除非研究人员和医学监察员认为可接受。

[0528] 4)根据研究人员的判断,用于多次抽血和研究药物施用的静脉通路不良。

[0529] 5)在本研究的单剂研究药物之前的28天或5个半衰期(以较长者为准)内使用任何经批准的生物制剂,包括单克隆抗体。

[0530] 6)在筛选前3个月内接受过活疫苗接种或计划在研究药物给药后3个月内接受疫苗接种。

[0531] 7)在第1天之前的8周内存在任何确认或疑似免疫缺陷状态或复发性、严重感染或慢性全身性免疫抑制剂药物治疗使用。

[0532] 8)乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎(HCV)抗体(除非针对HCV进行了充分治疗)或(人类免疫缺陷病毒)HIV-1和/或HIV-2抗体的血清学测试呈阳性。

[0533] 9)可能对受试者安全构成风险或干扰研究,或会使受试者不适合参与的临床显著病症、病况或疾病的历史或证据,例如临床显著的呼吸系统、肾脏、肝脏、胃肠道、血液、淋巴、神经、心血管、精神疾病。

[0534] 10)筛选时QuantiFERON-TB Gold Plus测试呈阳性。

[0535] 11)母乳喂养或筛选时血清妊娠测试呈阳性或第-1天血清妊娠测试呈阳性的女性。

[0536] 12)男性QTcF>450毫秒和女性QTcF>470毫秒,或经研究人员确定具有临床上有意义的ECG结果。

[0537] 13)生命体征测量包括以下内容(允许重复测量一次):

[0538] a.收缩压(BP)>140mm/Hg或舒张压>90mm/Hg。

[0539] b.收缩BP<90mm/Hg或舒张BP<50mm/Hg。

[0540] c.脉搏>100次每分钟(bpm)或<40bpm。

[0541] 14)在本研究的研究药物剂量后的28天或5个半衰期(以较长者为准)内参与任何其它研究并收到研究性产品或装置

[0542] 15)已知或疑似对BION-1301的任何成分过敏或有超敏反应,或对任何单克隆抗体有严重超敏反应史。

[0543] 出于分析目的,表37中定义了以下分析群体。

[0544] 表37:分析群体。

[0545]

群体	描述
PK	接受完整剂量的研究药物并且获得并成功分析了直至第 15 天的 PK 样品的所有受试者。
安全性	接受研究治疗的所有受试者。
PD	接受研究治疗并获得至少一份给药后 PD 样品并成功分析的所有受试者。

[0546] 一旦受试者通过所有纳入和排除标准并被随机分至治疗组之一,则认为受试者被招入。

[0547] 可评估受试者被定义为接受至少一剂研究治疗并提供基线后PK样品直至第15天的招入受试者。

[0548] 统计分析计划(SAP)是在数据库锁定之前制定并最终确定的,并更详细地描述了分析中要包括的受试者群体,以及对缺失、未使用和虚假数据进行说明的程序。

[0549] 所有药物动力学分析均使用Phoenix® WinNonlin®(8.1版)对PK群体进行。对每个治疗组分别提供所有PK终点的分析。PK参数通过非房室分析估计,包括但不限于以下者:

[0550]

参数	定义
C_0	外推至时间零的血清浓度
$C_{最大}$	观察到的最大血清浓度
$C_{最小}$	观察到的最小血清浓度
$t_{最大}$	对应于 $C_{最大}$ 发生的时间
F	生物利用度
$AUC_{最后}$	从时间 0 到最后观察时间点的血清浓度-时间曲线下面积
AUC_{0-t}	从时间 0 到 t 的血清浓度-时间曲线下面积
AUC_{0-inf}	从时间 0 到无穷大的血清浓度-时间曲线下面积
$T_{最大}$	达到最大血清浓度的时间
$t_{½}$	终末消除半衰期
CL	清除率
V_{ss}	稳态分布体积

[0551] MRT 平均停留时间

[0552] PK参数的测量值和估计值按组使用描述性统计(平均值、标准偏差[SD]、变异系数(CV%)、中值、最小值和最大值)制成表格和汇总。PK汇总统计可包括报告CV%、几何平均值和几何CV%(视情况而定)。如果可能,图形表示将包括PK采样时间的平均(±SD)血清浓度-时间曲线和个体受试者浓度-时间曲线。

[0553] 用于分析的PK参数规范;和所使用的统计显著性水平;处理缺失、未使用数据的程序;报告偏差的程序;以及分析群体中要包括的受试者的选择酌情呈现于SAP中。对每个治疗组内的PK参数进行了比较。

[0554] 本研究使用来自AMRI Glasgow的BION-1301 20mg/mL溶液批号P197673-0004L001/P02919和150mg/mL溶液批号P217955-0001L001/P04819完成。在给药前和输注/注射结束后0.25、2、4、8小时和给药后24小时(第2天)、48小时(第3天)、72小时(第4天)、168小时(第8天)、336小时(第15天)、672小时(第29天)、1008小时(第43天)和1344小时(第57天)收集受试者的PK和PD样品。在通过IV施用接受300mg IV剂量的17名受试者中,两名未完成研究,而在通过SC施用接受300mg剂量的17名受试者中,三名未完成研究,并被认为失访。发现任一途径的300mg剂量都是安全且耐受性良好的。测量了BION-1301血清水平、游离APRIL水平以及IgA、IgG和IgM抗体水平。

[0555] 平均(±SD)BION-1301血清浓度水平显示在图30中,其中时间0是BION-1301的给药时间。下表38提供了BION-1301对于IV与SC剂量施用的药物动力学参数。

[0556] 表38:IV与SC给药的几何平均汇总BION-1301PK参数。

[0557]

血清 PK 参数[a]	单位	静脉内	皮下
AUC_{0-14d}	天*ng/mL	750000 (21.1); 16	357000 (15.8); 16

[0558]

AUC_{0-28d}	天*ng/mL	1080000 (23.5); 16	576000 (16.1); 14
AUC_{0-t}	天*ng/mL	1280000 (28.1); 16	639000 (27.9); 16
AUC_{inf}	天*ng/mL	1330000 (29.7); 16	703000 (18.4); 14
$C_{最大}$	ng/mL	109000 (20.0); 17	31900 (15.5); 17
$t_{最大}$[b]	h	2.28 (2.25, 4.05); 17	72.85 (48.73, 168.02); 17
$t_{1/2}$	天	11.1 (24.3); 16	7.63 (24.2); 14
MRT_{inf}	天	16.3 (19.6); 16	16.9 (12.8); 14
CL	L/天	0.225 (29.7); 16	NR
CL/F	L/天	NR	0.427 (18.4); 14
V_{ss}	L	3.66 (16.3); 16	NR

[0559] [a]平几何均值(几何CV%);N

[0560] [b]中值(最小值;最大值);N

[0561] NR=未报告

[0562] 使用ANOVA评估IV BION-1301(参考)与SC BION-1301(测试)治疗之间的相对生物利用度,且结果显示在下表39中,其中测试治疗是SC施用的300mg BION-1301,参考治疗是静脉内施用的300mg BION-1301,且CI=置信区间,CV=变异系数,LSM=最小二乘均值,且N=观察次数。

[0563] 表39:静脉内与皮下BION-1301治疗之间的相对生物利用度。

[0564]

血清PK参数	单位	测试几何LSM; N	参考几何LSM; N	几何LSM比(%)	90% CI	受试者间(CV%)
AUC_{inf}	天*ng/mL	702500; 14	1334000; 16	52.67	(45.18, 61.41)	25.0
AUC_{0-t}	天*ng/mL	638900; 16	1282000; 16	49.84	(42.27, 58.78)	28.0
$C_{最大}$	ng/mL	31940; 17	108500; 17	29.43	(26.54, 32.63)	17.9
AUC_{0-14d}	天*ng/mL	357200; 16	750100; 16	47.62	(42.62, 53.21)	18.6
AUC_{0-28d}	天*ng/mL	575800; 14	1075000; 16	53.54	(47.22, 60.71)	20.4

[0565] 对于APRIL浓度的测量,单剂量IV或SC施用后的平均(±SD)fAPRIL浓度显示在图31A中,并且在单剂量IV或SC施用后相对于fAPRIL基线的平均(±SD)百分比变化显示在图31B中,其中时间0是BION-1301的给药时间。下表40提供了IV与SC剂量施用后fAPRIL的药效学参数,其中B下$AUEC_{0-t}$是使用线性梯形插值规则,从时间点0到时间点t在基线效应值下的反应曲线的面积,$R_{最小}$是给药后观察到的最小反应值,$PBR_{最小}$是给药后相对于基线反应值的最小百分比变化,计算为$(R_{最小}-B)/B\times100$,并且$t_{最小}$是$R_{最小}$的时间。

[0566] 表40:平均汇总fAPRIL药效学参数。

[0567]

血清PD参数[a]	单位	静脉内	皮下
B下AUEC	天*ng/mL	804 (52.2); 16	446 (58.1); 16
B下$AUEC_{0-7d}$	天*ng/mL	134 (40.7); 17	93.3 (47.9); 17
B下$AUEC_{0-14d}$	天*ng/mL	274 (40.9); 16	195 (49.3); 16
B下$AUEC_{0-28d}$	天*ng/mL	519 (42.6); 16	345 (45.3); 14
基线	ng/mL	23.3 (36.4); 17	21.3 (41.2); 17
$R_{最小}$	ng/mL	3.13 (32.3); 17	6.29 (35.5); 17
$PBR_{最小}$	%	-86.0 (-4.3); 17	-69.5 (-10); 17
$t_{最小}$[b]	h	4.00 (2.25, 168.05); 17	168.02 (8.00, 673.83); 17

[0568] 对于免疫球蛋白水平的测量,在图32A(IgA)、32B(IgG)和32C(IgM)中显示了BION-1301的IV与SC给药的血清免疫球蛋白水平随时间相对于基线的平均变化%。

[0569] 本领域技术人员容易理解,本发明很好地适用于实现所述目标并获得所提到的目的和优点,以及其中固有的目的和优点。本文提供的实例是优选实施方案的代表,是示例性的,并且不旨在限制本发明的范围。

[0570] 应理解,本发明的应用不限于以下描述中所阐述或附图中所示出的组件构造和布置的细节。本发明能够具有除了所描述的实施方案之外的实施方案并且能够以各种方式实践和执行。此外,应理解,本文采用的措辞和术语以及摘要是为了描述的目的并且不应被视为限制性的。

[0571] 因此,本领域技术人员将理解,本公开所基于的概念可容易地用作设计用于实现

本发明的若干目的的其它结构、方法和系统的基础。因此，重要的是，权利要求书被认为包括这样的等效结构，只要它们不脱离本发明的精神和范围。

[0572] 尽管本发明已经被充分详细地描述和举例说明以使本领域技术人员能够进行制造和使用，但是在不背离本发明的精神和范围的情况下，各种替代、修改和改进应该是显而易见的。本文提供的实例是优选实施方案的代表，是示例性的，并且不旨在限制本发明的范围。本领域技术人员将想到其中的修改和其它用途。这些修改包含在本发明的精神内并且由权利要求书的范围限定。

[0573] 对于本领域的技术人员来说显而易见的是，在不背离本发明的范围和精神的情况下，可对本文公开的本发明进行各种替换和修改。

[0574] 说明书中提及的所有专利申请、专利、出版物和其它参考文献均表示本发明所属领域的普通技术人员的水平，并且均以引用方式并入本文。本文引用的参考文献不被承认是要求保护的发明的现有技术。

[0575] 除非另有限定，否则本文中所使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所理解相同的含义。在冲突的情况下，将以本说明书(包括定义)为准。

[0576] 在说明书和权利要求书中使用冠词“一(a/an)”和“所述”应解释为涵盖单数和复数，除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。除非另有说明，否则术语“包含”、“具有”、“属于”如“属于化学式”、“包括”和“含有”应解释为开放性术语(即，意为“包括但不限于”)。另外，每当在实施方案中使用“包含”或另一开放式术语时，应理解，可使用中间术语“基本上由.....组成”或封闭术语“由.....组成”来更狭义地要求保护相同实施方案。

[0577] 当与数值结合使用时，术语“约”、“大约”或“近似”意指包括值的集合或范围。例如，“约X”包括X的±20％、±10％、±5％、±2％、±1％、±0.5％、±0.2％或±0.1％的值范围，其中X是数值。在一个实施方案中，术语“约”是指比指定值多或少10％的值范围。在另一实施方案中，术语“约”是指比指定值多或少5％的值范围。在另一实施方案中，术语“约”是指比指定值多或少1％的值范围。

[0578] 除非本文另外指明，否则值范围的列举仅仅意图用作个别地表示属于所述范围的各单独值的速记方法，并且犹如本文个别描述地那样将各单独值并入到本说明书中。除非另有说明，否则本文使用的范围包括所述范围的两个极限。例如，术语“在X与Y之间”和“在X至Y的范围内”包括X和Y以及它们之间的整数。另一方面，当在本公开中提及一系列单个值时，本公开中还设想了包括两个单个值中的任一个作为两个端点的任何范围。例如，表述“约100mg、200mg或400mg的剂量”还可意指“100至200mg范围内的剂量”、“200至400mg范围内的剂量”或“100至400mg范围内的剂量”。

[0579] 本文中说明性描述的本发明可在不存在本文未具体公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下实践。因此，例如，在本文的每个实例中，术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”中的任一个可被其它两个术语中的任一个替换。已使用的术语和表述被用作描述而非限制的术语，并且在使用这些术语和表述时无意排除所示和描述的特征或其部分的任何等效物，但应认识到在要求保护的本发明的范围内可能进行各种修改。因此，应理解，虽然本发明已通过优选实施方案和可选特征具体公开，但本领域技术人员可对本文公开的概念进行修改和变化，并且这些修改和变化被认为是在所附权利要求书限定的本发明范围内。

[0580] 其它实施方案阐述于以下权利要求书内。

样品		H75 浓度 (mg/mL) 浊度 (A330) 视觉外观 * pH															
		t=0	−70°C		2−8°C			25°C			45°C		F/T	2−8°C			
			t=6 周	t=12 周	t=1 周	t=3 周	t=6 周	t=12 周	t=1 周	t=3 周	t=6 周	t=12 周	t=1 周	t=3 周	5 个循环	摇动 3 天
10mM组氨酸	150mM 精氨酸, 150mM 谷氨酸, 0.01% PS20, pH 6.1	159 0.703 C,Y,NP 6.13	151 0.785 C,Y,NP 6.14	154 0.694 C,Y,NP 6.15	160 0.704 C,Y,NP 6.12	159 0.700 C,Y,NP 6.16	148 0.745 C,Y,NP 6.16	141 0.709 C,Y,NP 6.15	159 0.763 C,Y,NP 6.12	150 0.763 C,Y,NP 6.15	149 0.838 C,Y,NP 6.16	142 0.833 C,Y,NP 6.14	156 0.837 C,Y,NP 6.13	157 0.920 C,Y,NP 6.14	150 0.684 C,Y,NP 6.14	147 0.655 C,Y,NP 6.13
	55mM精氨酸, 55mM谷氨酸, 3% 山梨醇, 0.01% PS20, pH 6.3	162 0.708 C,Y,NP 6.34	145 0.729 C,Y,NP 6.35	146 0.720 C,Y,NP 6.34	151 0.739 C,Y,NP 6.31	158 0.733 C,Y,NP 6.34	155 0.725 C,Y,NP 6.34	148 0.731 C,Y,NP 6.33	167 0.721 C,Y,NP 6.33	158 0.840 C,Y,NP 6.31	155 0.834 C,Y,NP 6.33	150 0.842 C,Y,NP 6.31	156 0.854 C,Y,NP 6.3	147 0.969 C,Y,P 6.33	153 0.699 C,Y,NP 6.32	144 0.678 C,Y,NP 6.34
	150mM 精氨酸, 150mM 谷氨酸, 0.01% PS20, pH 6.3	162 0.753 C,Y,NP 6.36	154 0.778 C,Y,NP 6.32	150 0.758 C,Y,NP 6.34	157 0.759 C,Y,NP 6.31	163 0.756 C,Y,NP 6.34	155 0.790 C,Y,NP 6.34	149 0.758 C,Y,NP 6.34	165 0.768 C,Y,NP 6.32	168 0.797 C,Y,NP 6.31	154 0.867 C,Y,NP 6.35	149 0.936 C,Y,NP 6.34	166 0.891 C,Y,NP 6.32	152 1.081 C,Y,P 6.33	163 0.746 C,Y,NP 6.32	158 0.707 C,Y,NP 6.35
	75mM精氨酸, 3% 山梨醇, 0.01% PS20, pH 6.1	165 0.753 C,Y,NP 6.14	152 0.795 C,Y,NP 6.15	154 0.763 C,Y,NP 6.14	171 0.758 C,Y,NP 6.12	169 0.763 C,Y,NP 6.15	156 0.793 C,Y,NP 6.13	148 0.763 C,Y,NP 6.13	167 0.750 C,Y,NP 6.11	174 0.847 C,Y,NP 6.11	157 0.843 C,Y,NP 6.12	156 0.838 C,Y,NP 6.12	160 0.961 C,Y,NP 6.09	159 1.024 C,Y,NP 6.13	160 0.735 C,Y,NP 6.13	158 0.702 C,Y,NP 6.14

图1

样品组成		SE-UPLC（纯度%） *HMW* 主峰 LMW																
		t=0	-70°C		2-8°C			25°C				45°C			F/T	2-8°C
			t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	5个循环	摇动3天
10mM组氨	150mM精氨酸，150mM谷氨酸，0.01% PS20，pH 6.1	3.0	3.2	3.3	3.3	3.4	3.4	3.4	3.3	3.3	3.6	3.7	3.7	4.4	3.2	3.1
		96.8	96.7	96.6	96.6	96.5	96.6	96.5	96.6	96.5	96.3	96.2	96.2	95.4	96.7	96.5
		0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4
	55mM精氨酸，55mM谷氨酸，3%山梨醇，0.01% PS20，pH 6.3	3.0	3.2	3.3	3.3	3.4	3.4	3.6	3.5	3.6	3.7	3.9	4.0	4.6	3.2	3.2
		96.8	96.7	96.6	96.7	96.6	96.5	96.4	96.4	96.2	96.2	96.0	96.0	95.2	96.7	96.6
		0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
	150mM精氨酸，150mM谷氨酸，0.01% PS20，pH 6.3	2.9	3.1	3.3	3.3	3.4	3.4	3.5	3.4	3.4	3.5	3.9	3.8	4.3	3.2	3.2
		96.7	96.8	96.6	96.6	96.6	96.6	96.5	96.5	96.5	96.4	96.0	96.1	95.3	96.7	96.7
		0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	0.2
	75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01% PS20，pH 6.1	3.0	3.2	3.4	3.3	3.3	3.5	3.4	3.5	3.5	3.7	4.0	4.1	4.3	3.3	3.2
		96.8	96.7	96.5	96.6	96.6	96.5	96.5	96.4	96.4	96.2	95.9	95.8	95.4	96.7	96.7
		0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1

图2

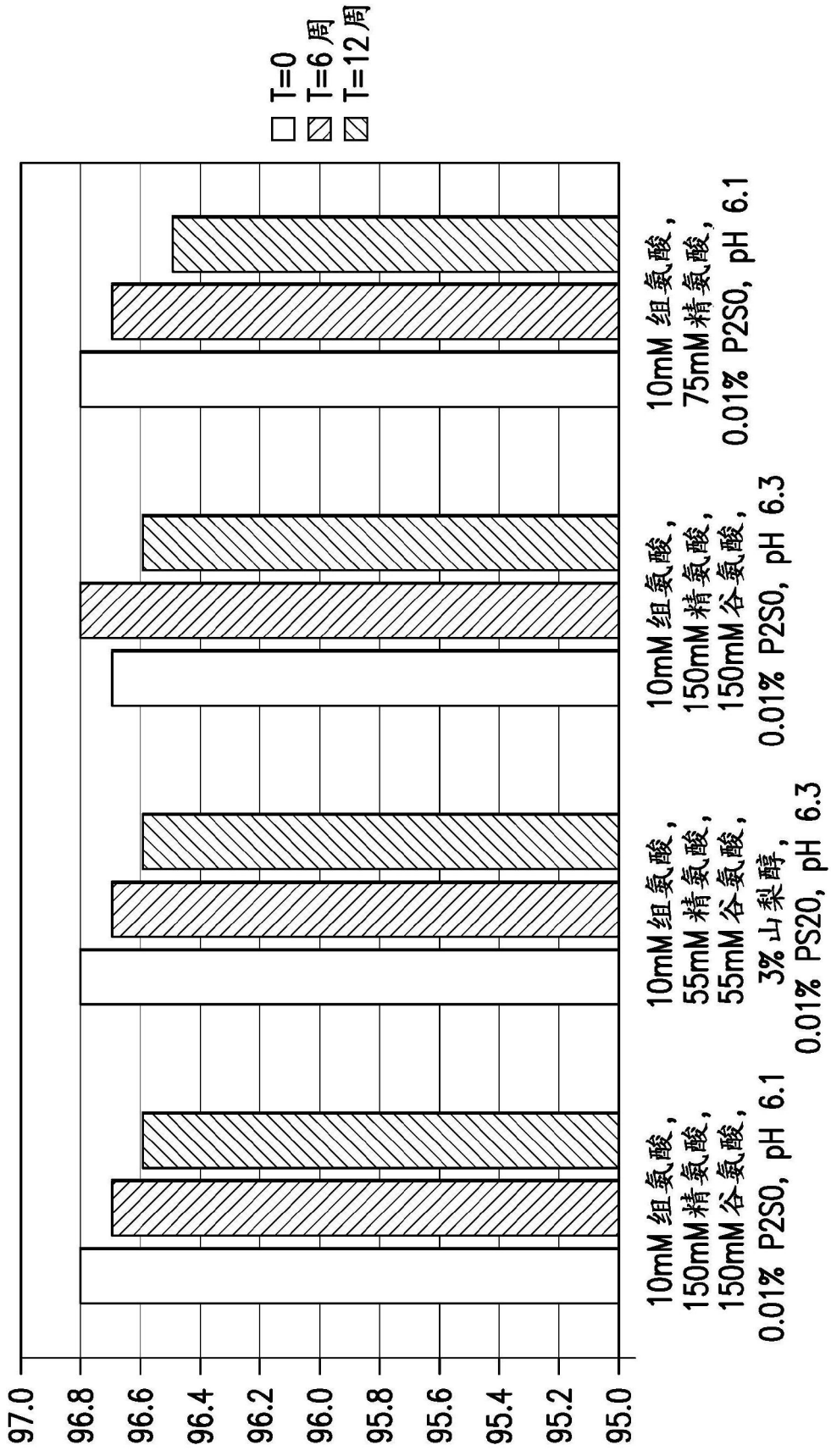

T=0
T=6周
T=12周
97.0
96.8
96.6
96.4
96.2
96.0
95.8
95.6
95.4
95.2
95.0
10mM组氨酸，
150mM精氨酸，
150mM谷氨酸，
0.01% P2S0, pH 6.1
10mM组氨酸，
55mM精氨酸，
55mM谷氨酸，
3%山梨醇，
0.01% PS20, pH 6.3
10mM组氨酸，
150mM精氨酸，
150mM谷氨酸，
0.01% P2S0, pH 6.3
10mM组氨酸，
75mM精氨酸，
0.01% P2S0, pH 6.1

图3

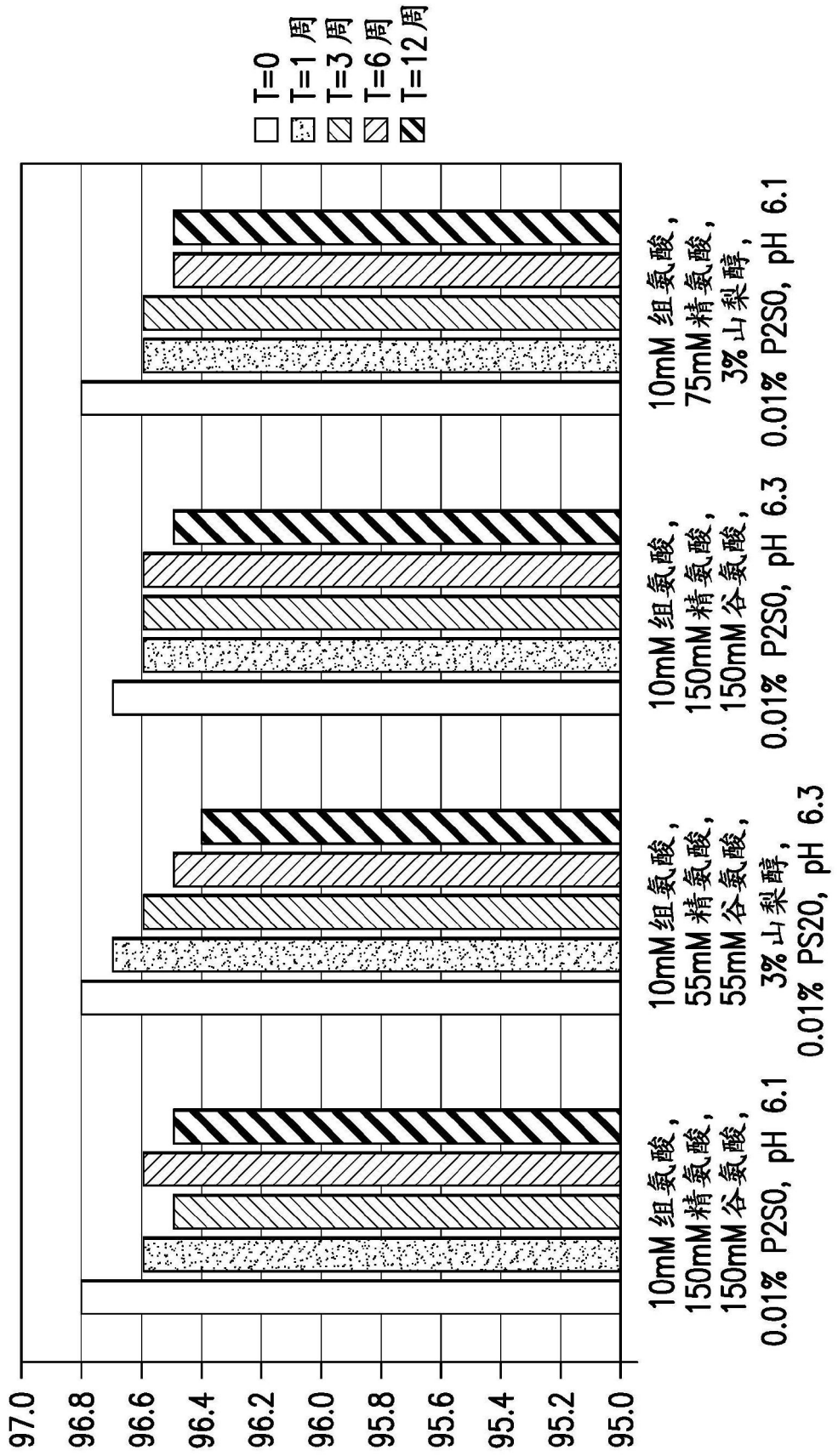

T=0
T=1 周
T=3 周
T=6 周
T=12 周
97.0
96.8
96.6
96.4
96.2
96.0
95.8
95.6
95.4
95.2
95.0
10mM 组氨酸，
150mM 精氨酸，
150mM 谷氨酸，
0.01% P2S0, pH 6.1
10mM 组氨酸，
55mM 精氨酸，
55mM 谷氨酸，
3% 山梨醇，
0.01% PS20, pH 6.3
10mM 组氨酸，
150mM 精氨酸，
150mM 谷氨酸，
3% 山梨醇，
0.01% P2S0, pH 6.3
10mM 组氨酸，
75mM 精氨酸，
3% 山梨醇，
0.01% P2S0, pH 6.1

图4

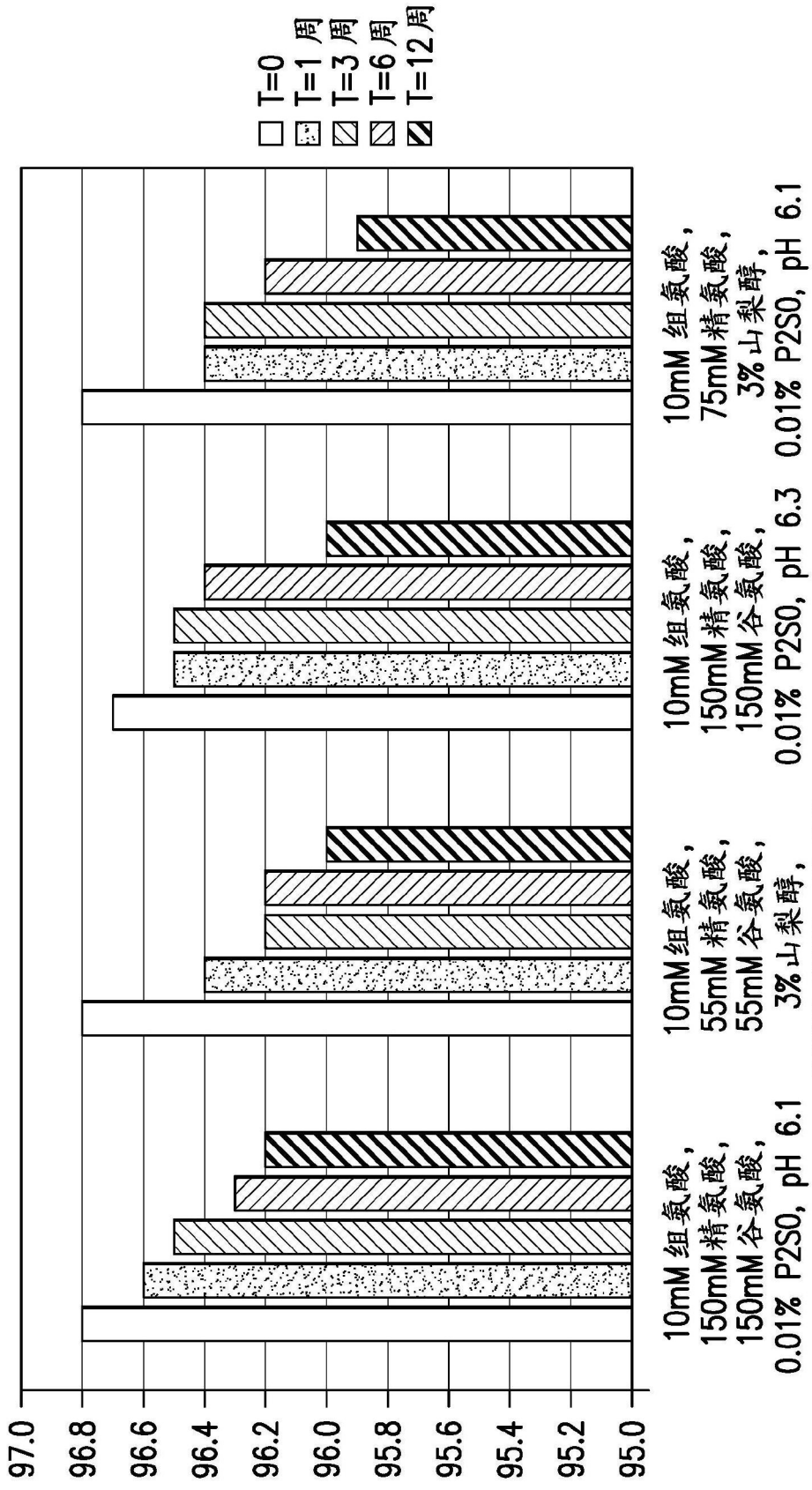

T=0
T=1 周
T=3 周
T=6 周
T=12 周
97.0
96.8
96.6
96.4
96.2
96.0
95.8
95.6
95.4
95.2
95.0
10mM 组氨酸，
150mM 精氨酸，
150mM 谷氨酸，
0.01% P2S0, pH 6.1
10mM 组氨酸，
55mM 精氨酸，
55mM 谷氨酸，
3% 山梨醇，
0.01% PS20, pH 6.3
10mM 组氨酸，
150mM 精氨酸，
150mM 谷氨酸，
0.01% P2S0, pH 6.3
10mM 组氨酸，
75mM 精氨酸，
3% 山梨醇，
0.01% P2S0, pH 6.1

图5

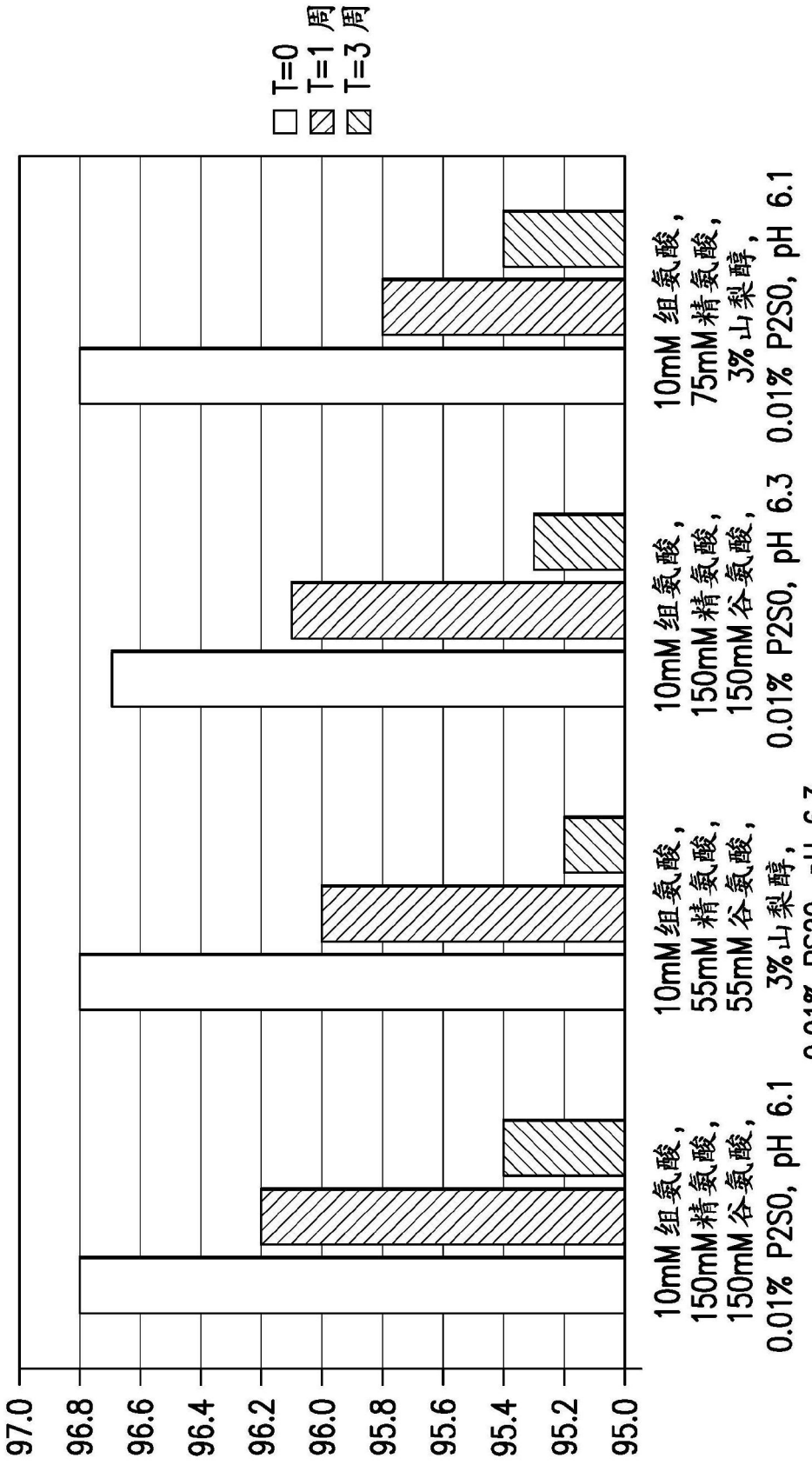

T=0
T=1 周
T=3 周
97.0
96.8
96.6
96.4
96.2
96.0
95.8
95.6
95.4
95.2
95.0
10mM 组氨酸，
150mM 精氨酸，
150mM 谷氨酸，
0.01% P2S0, pH 6.1
10mM 组氨酸，
55mM 精氨酸，
55mM 谷氨酸，
3% 山梨醇，
0.01% PS20, pH 6.3
10mM 组氨酸，
150mM 精氨酸，
150mM 谷氨酸，
0.01% P2S0, pH 6.3
10mM 组氨酸，
75mM 精氨酸，
3% 山梨醇，
0.01% P2S0, pH 6.1

图6

样品组成		(纯度%) 酸性主峰碱性													
		t=0	-70°C		2-8°C			25°C			45°C		F/T 5个循环	2-8°C 摇动3天
			t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	t=6周	t=12周	t=1周	t=3周		
10mM组氨酸	150mM精氨酸，150mM谷氨酸，0.01% PS20，pH 6.1	21.7	21.8	21.8	21.8	22.0	21.9	22.1	22.0	22.8	24.5	28.3	26.7	37.4	21.7	21.6
		63.3	63.3	63.3	63.2	63.1	63.2	63.3	63.2	62.6	61.4	58.5	59.1	49.8	63.3	63.5
		15.1	14.9	14.9	15.0	14.9	14.9	14.7	14.9	14.6	14.0	13.2	14.3	12.8	15.0	14.9
	55mM精氨酸，55mM谷氨酸，3%山梨醇，0.01% PS20，pH 6.3	21.9	21.9	21.9	21.9	22.0	22.2	22.3	22.1	23.2	25.1	29.0	27.4	38.9	21.8	21.7
		63.2	63.2	63.3	63.2	63.1	63.1	63.3	63.0	62.5	61.1	58.3	58.6	49.0	63.3	63.4
		14.9	14.9	14.8	14.9	14.9	14.7	14.5	14.8	14.3	13.8	12.7	14.0	12.1	14.9	14.8
	150mM精氨酸，150mM谷氨酸，0.01% PS20，pH 6.3	21.6	21.7	21.8	21.9	22.0	22.2	22.3	22.3	23.4	25.3	29.9	27.9	39.8	21.9	21.7
		63.4	63.3	63.3	63.1	63.0	63.1	63.1	62.8	62.2	60.7	57.2	58.1	48.0	63.2	63.4
		15.0	14.9	14.9	15.0	15.0	14.8	14.6	14.8	14.4	13.9	13.0	13.9	12.2	14.9	14.8
	75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01% PS20，pH 6.1	21.7	21.8	21.8	22.0	22.1	22.1	22.2	21.9	22.8	24.2	27.2	26.0	35.6	21.8	21.8
		63.3	63.3	63.4	63.0	63.0	63.1	63.3	63.1	62.7	61.8	59.5	59.2	51.2	63.2	63.3
		15.1	14.9	14.8	15.0	14.9	14.8	14.5	15.0	14.5	14.0	13.3	14.8	13.2	15.0	14.9

图7

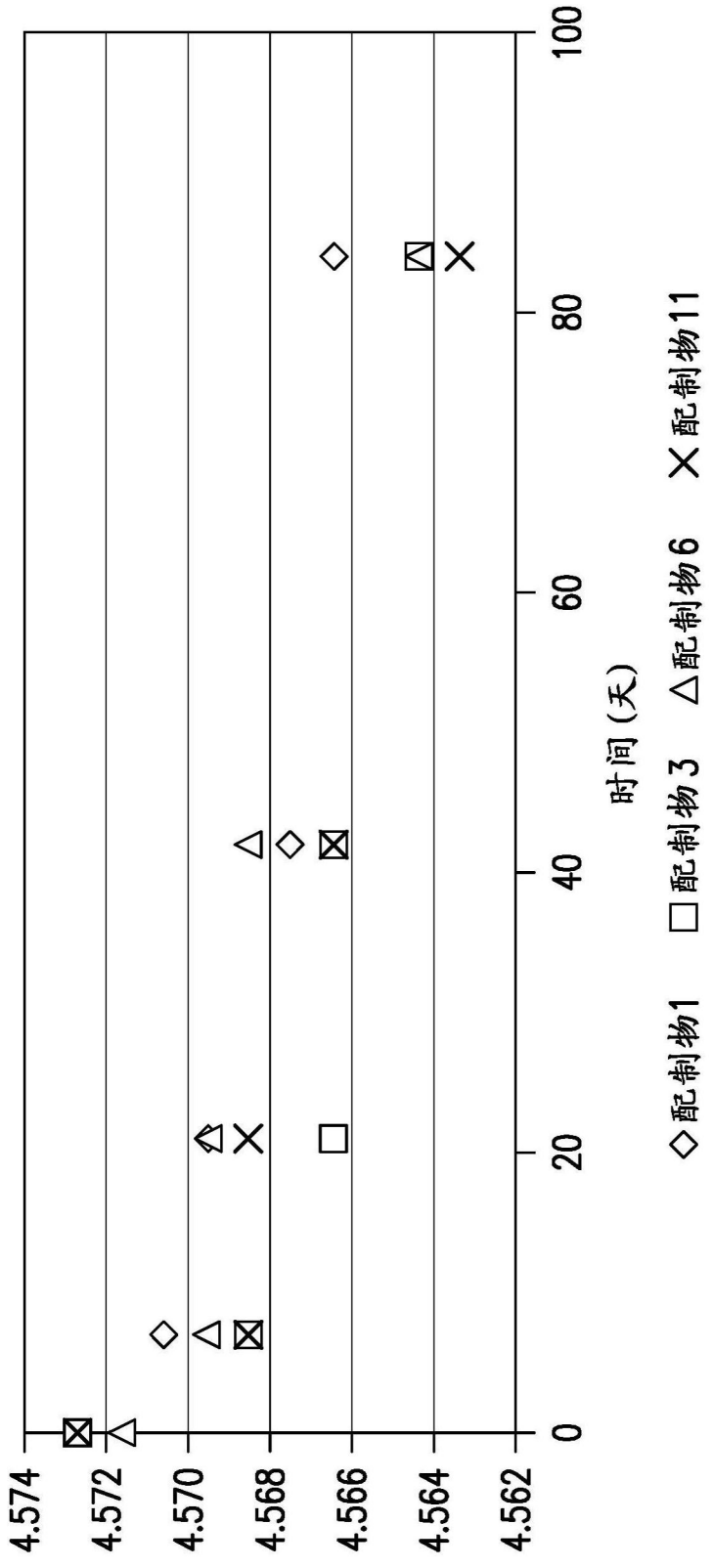

4.574
4.572
4.570
4.568
4.566
4.564
4.562
0
20
40
60
80
100
时间(天)
◇配制物1
□配制物3
△配制物6
×配制物11

图8

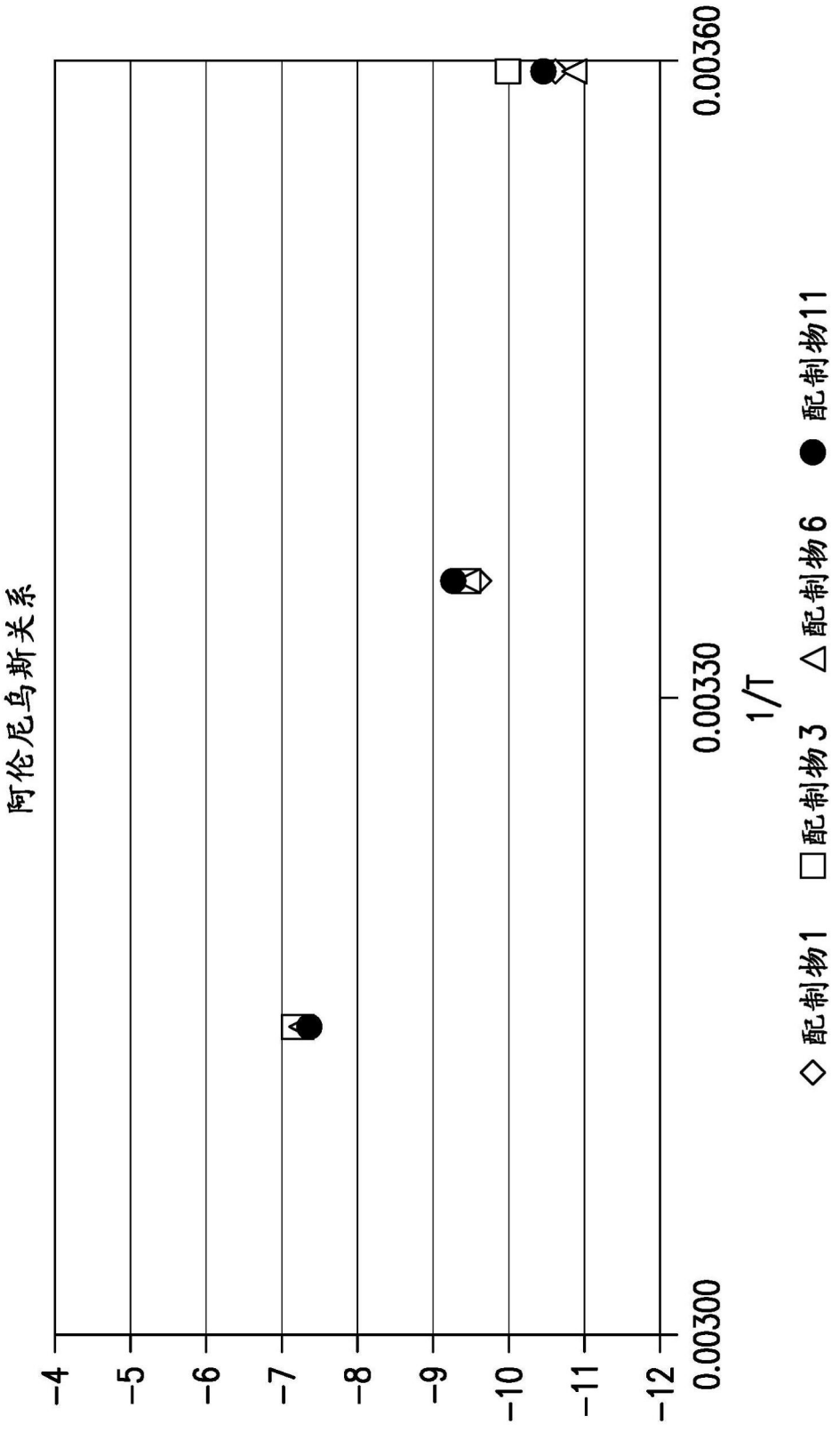

阿伦尼乌斯关系
-4
-5
-6
-7
-8
-9
-10
-11
-12
0.00300
0.00330
0.00360
1/T
◇ 配制物1
□ 配制物3
△ 配制物6
● 配制物11

图9

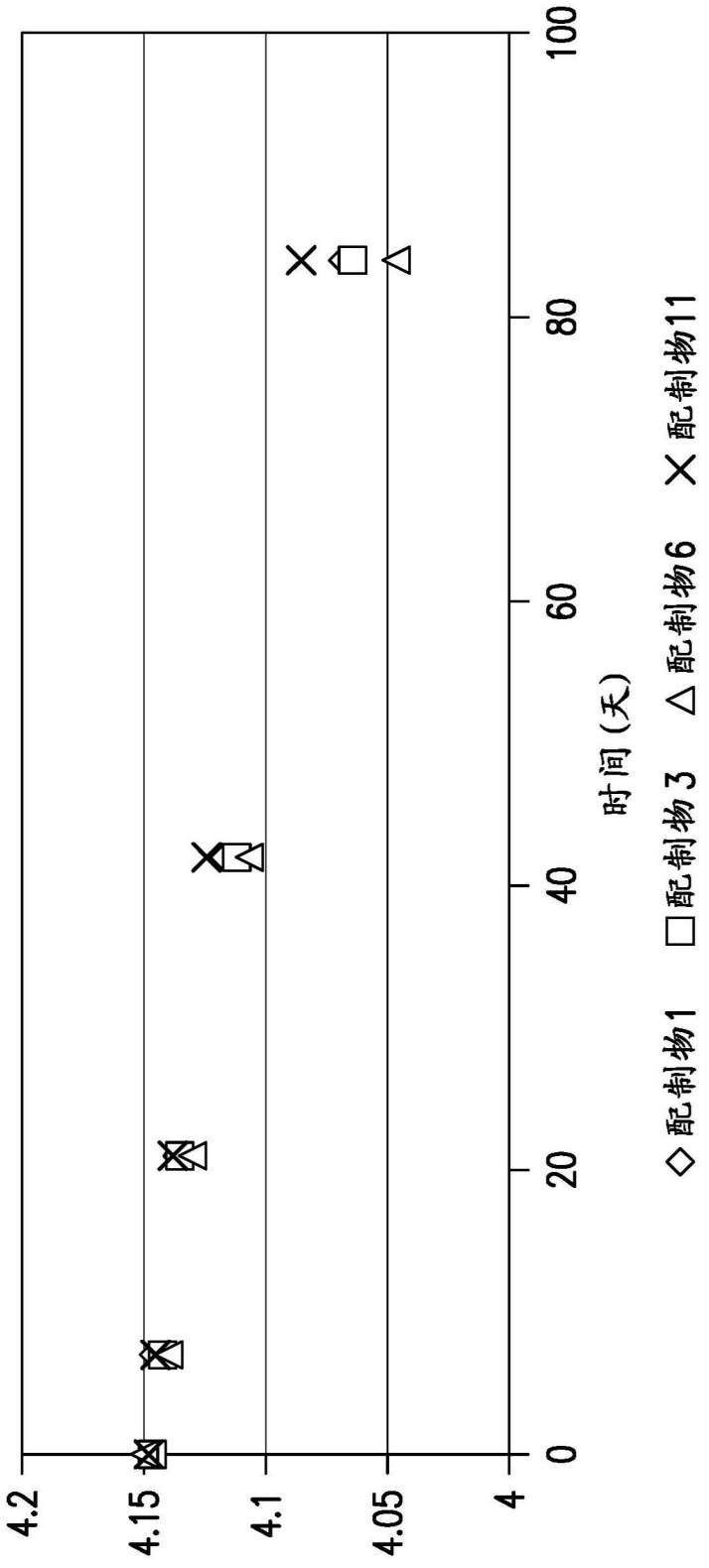


图10

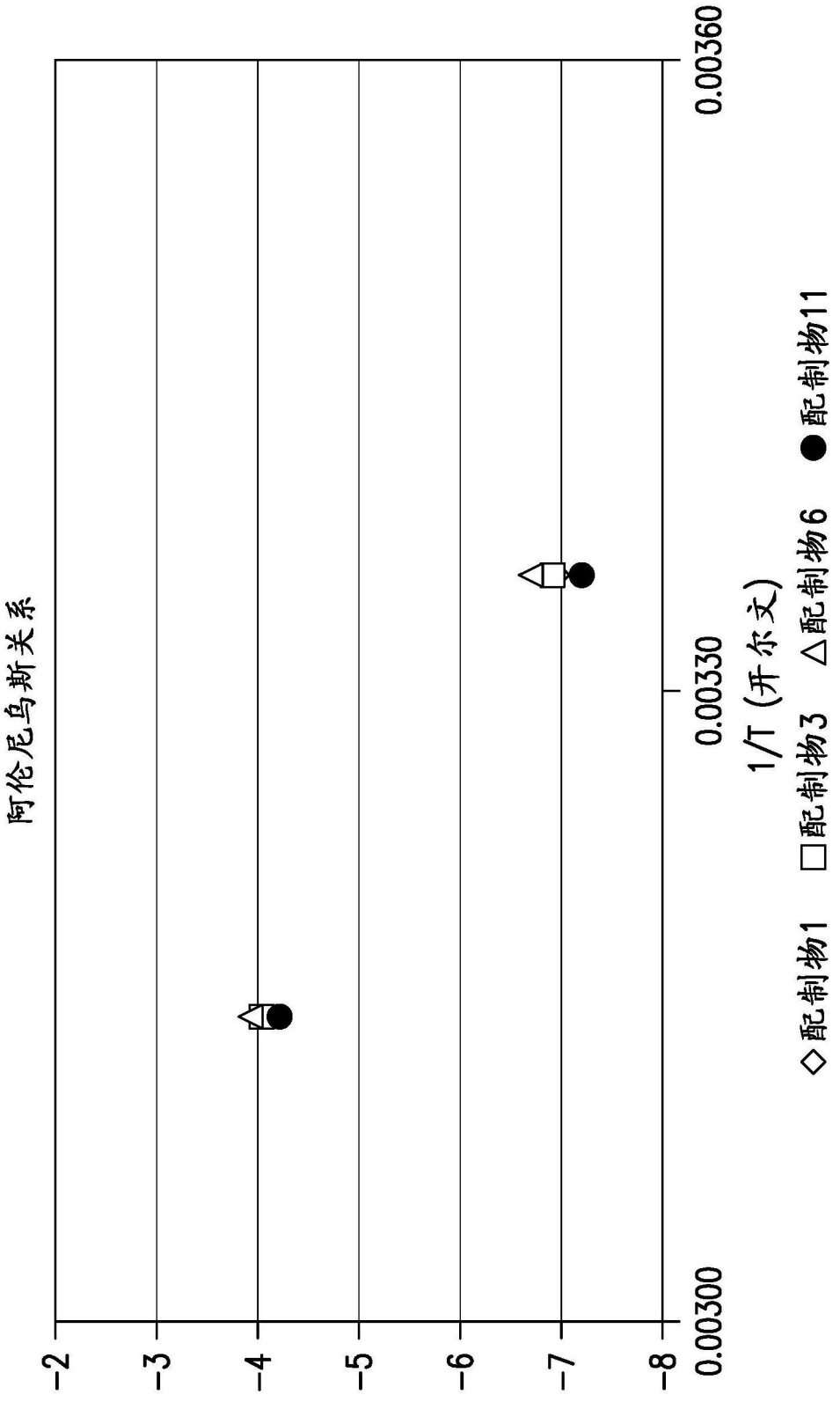
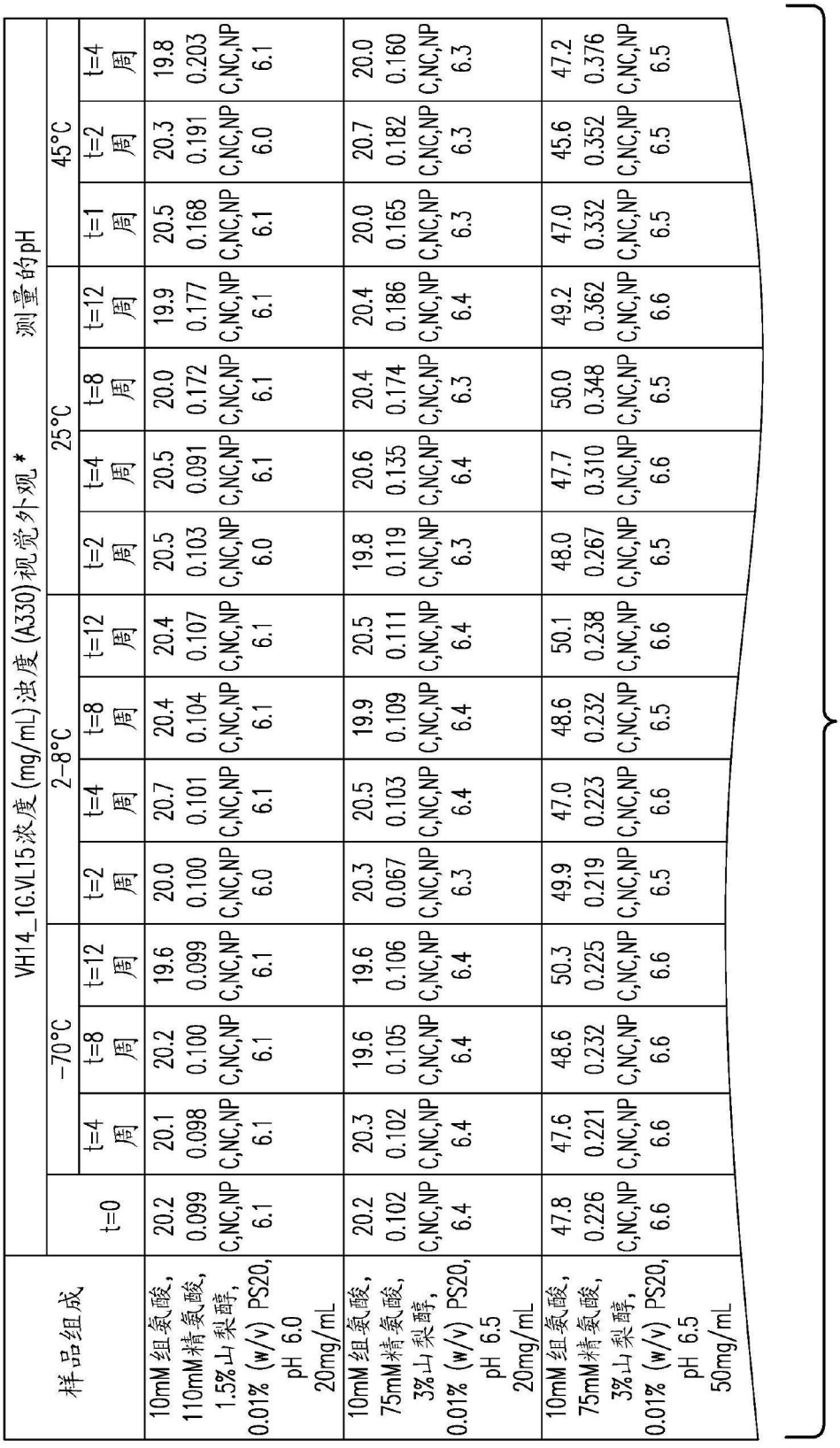

阿伦尼乌斯关系
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
0.00300
0.00330
0.00360
1/T (开尔文)
◇配制物1
□配制物3
△配制物6
●配制物11

图11

样品组成		流体动力学半径(nm)/% Ms														
		t=0	−70°C		2−8°C			25°C			45°C		F/T 5个循环	2−8°C 摇动 3天
			t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	t=6周	t=12周	t=1周	t=3周	t=6周	t=12周	t=1周	t=3周		
150mM精氨酸，150mM谷氨酸，0.01% PS20，pH 6.1		6.8/ 99.7 387.5/ 0.3	6.9/ 99.8 382.6/ 0.2	7.0/ 99.7 291.3/ 0.3	6.9/ 99.6 709.6/ 0.4	6.9/ 99.1 634/ 0.9	6.9/ 99.3 526.0/ 0.3 2659.2/ 0.4	6.6/ 99.8 346.5/ 0.2	7.0/ 99.8 68.1/ 0.0 587.8/ 0.2	6.6/ 99.6 585.4/ 0.4	7.1/ 99.8 498.1/ 0.2	6.9/ 99.8 355.3 0.2	6.9/ 99.6 370.7/ 0.4	6.4/ 99.6 344.5/ 0.4	6.6/ 99.7 381/ 0.3	6.7/ 99.4 601.0/ 0.6
10mM 组氨酸缓冲液	55mM精氨酸，55mM谷氨酸，3%山梨醇，0.01% PS20，pH 6.3	7.3/ 99.7 736.6/ 0.3	7.4/ 99.8 422.3/ 0.2	7.2/ 99.6 678.2/ 0.4	7.2/ 99.6 1244.5/ 0.4	7.0/ 99.7 755.4/ 0.3	7.4/ 99.8 382.5/ 0.2	7.0/ 99.6 986.9/ 0.4	7.6/ 99.9 608.5/ 0.1	6.7/ 99.8 583.4/ 0.2	6.9/ 99.7 743.4/ 0.3	7.3/ 99.3 1521.3/ 0.7	7.1/ 99.5 639.1/ 0.5	7.1/ 99.5 451.2/ 0.5	7.1/ 99.8 572.7/ 0.2	6.9/ 99.7 479.9/ 0.3
	150mM精氨酸，150mM谷氨酸，0.01% PS20，pH 6.3	6.9/ 99.6 426.7/ 0.4	7.6/ 99.5 471.0/ 0.5	7.4/ 99.4 796.7/ 0.6	7.3/ 99.3 766.1/ 0.7	7.0/ 99.5 765.0/ 0.5	7.4/ 99.5 644.2/ 0.5	7.4/ 99.5 765.3/ 0.5	7.2/ 99.6 585.4/ 0.4	7.0/ 99.1 1643.9/ 0.9	7.5/ 99.5 722.3/ 0.5	7.4/ 99.2 956.0/ 0.8	7.4/ 99.0 618.1/ 1.0	7.5/ 99.1 475.0/ 0.9	7.3/ 99.5 517.0/ 0.5	7.3/ 99.3 635.9/ 0.7
	75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01% PS20，pH 6.1	7.9/ 99.3 777.0/ 0.7	7.8/ 99.3 829.7/ 0.7	8.1/ 99.1 698.9/ 0.9	8.0/ 99.6 479.8/ 0.4	7.5/ 99.6 328.2/ 0.4	7.7/ 99.6 392.04/ 0.4	7.9/ 99.5 519.7/ 0.5	7.8/ 99.4 638.5/ 0.6	7.3/ 99.8 264.1/ 0.2	7.6/ 99.2 214.8/ 0.2 4344.7/ 0.6	8.2/ 99.2 877.7/ 0.8	7.8/ 98.9 522.4/ 1.1	7.8/ 99.0 424.6/ 1.0	6.9/ 99.4 675.8/ 0.6	7.8/ 98.9 1187.8/ 1.1

图12



样品组成	VH14_1G.VL15浓度(mg/mL)浊度(A330)视觉外观* 测量的pH																	
	t=0	−70°C			2–8°C			25°C				45°C						
		t=4周	t=8周	t=12周	t=2周	t=4周	t=8周	t=12周	t=2周	t=4周	t=8周	t=12周	t=1周	t=2周	t=4周			
10mM组氨酸，110mM精氨酸，1.5%山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.0 20mg/mL	20.2 0.099 C,NC,NP 6.1	20.1 0.098 C,NC,NP 6.1	20.2 0.100 C,NC,NP 6.1	19.6 0.099 C,NC,NP 6.1	20.0 0.100 C,NC,NP 6.0	20.7 0.101 C,NC,NP 6.1	20.4 0.104 C,NC,NP 6.1	20.4 0.107 C,NC,NP 6.1	20.5 0.103 C,NC,NP 6.0	20.5 0.091 C,NC,NP 6.1	20.0 0.172 C,NC,NP 6.1	19.9 0.177 C,NC,NP 6.1	20.5 0.168 C,NC,NP 6.1	20.3 0.191 C,NC,NP 6.0	19.8 0.203 C,NC,NP 6.1			
10mM组氨酸，75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20mg/mL	20.2 0.102 C,NC,NP 6.4	20.3 0.102 C,NC,NP 6.4	19.6 0.105 C,NC,NP 6.4	19.6 0.106 C,NC,NP 6.4	20.3 0.067 C,NC,NP 6.3	20.5 0.103 C,NC,NP 6.4	19.9 0.109 C,NC,NP 6.4	20.5 0.111 C,NC,NP 6.4	19.8 0.119 C,NC,NP 6.3	20.6 0.135 C,NC,NP 6.4	20.4 0.174 C,NC,NP 6.3	20.4 0.186 C,NC,NP 6.4	20.0 0.165 C,NC,NP 6.3	20.7 0.182 C,NC,NP 6.3	20.0 0.160 C,NC,NP 6.3			
10mM组氨酸，75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 50mg/mL	47.8 0.226 C,NC,NP 6.6	47.6 0.221 C,NC,NP 6.6	48.6 0.232 C,NC,NP 6.6	50.3 0.225 C,NC,NP 6.6	49.9 0.219 C,NC,NP 6.5	47.0 0.223 C,NC,NP 6.6	48.6 0.232 C,NC,NP 6.5	50.1 0.238 C,NC,NP 6.6	48.0 0.267 C,NC,NP 6.5	47.7 0.310 C,NC,NP 6.6	50.0 0.348 C,NC,NP 6.5	49.2 0.362 C,NC,NP 6.6	47.0 0.332 C,NC,NP 6.5	45.6 0.352 C,NC,NP 6.5	47.2 0.376 C,NC,NP 6.5			

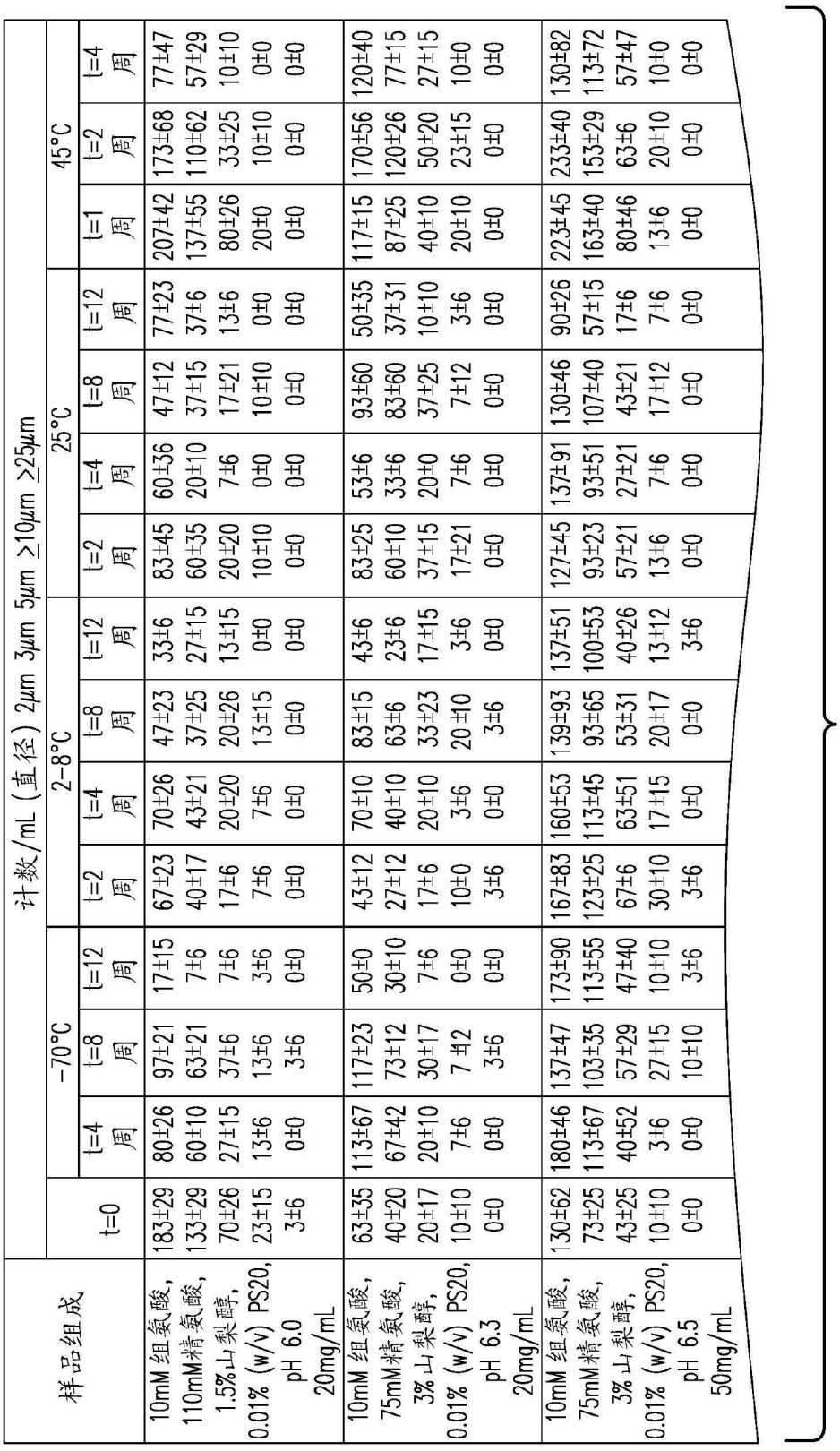
在图13B继续

图13A

从图13A继续

10mM组氨酸，75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20mg/mL	20.1 0.112 C,NC,NP 6.6	19.9 0.106 C,NC,NP 6.6	19.8 0.115 C,NC,NP 6.6	20.0 0.116 C,NC,NP 6.6	19.9 0.083 C,NC,NP 6.5	19.9 0.107 C,NC,NP 6.6	19.8 0.113 C,NC,NP 6.6	20.4 0.115 C,NC,NP 6.6	20.1 0.127 C,NC,NP 6.5	20.1 0.158 C,NC,NP 6.6	20.2 0.204 C,NC,NP 6.5	20.4 0.219 C,NC,NP 6.6	19.7 0.180 C,NC,NP 6.6	20.0 0.192 C,NC,NP 6.5	20.2 0.217 C,NC,NP 6.5
10mM组氨酸，55mM精氨酸，55mM谷氨酸，3%山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20mg/mL	20.4 0.101 C,NC,NP 6.5	19.9 0.098 C,NC,NP 6.6	20.3 0.105 C,NC,NP 6.5	20.5 0.099 C,NC,NP 6.6	20.4 0.094 C,NC,NP 6.5	20.2 0.072 C,NC,NP 6.5	20.3 0.111 C,NC,NP 6.5	20.5 0.108 C,NC,NP 6.5	20.1 0.111 C,NC,NP 6.5	20.0 0.123 C,NC,NP 6.5	20.4 0.175 C,NC,NP 6.5	20.5 0.203 C,NC,NP 6.5	20.4 0.156 C,NC,NP 6.5	19.9 0.180 C,NC,NP 6.5	20.1 0.196 C,NC,NP 6.5

图13B



样品组成	计数/mL（直径）2μm 3μm 5μm ≥10μm ≥25μm															
	t=0	-70°C			2-8°C				25°C				45°C			
		t=4周	t=8周	t=12周	t=2周	t=4周	t=8周	t=12周	t=2周	t=4周	t=8周	t=12周	t=1周	t=2周	t=4周
10mM 组氨酸，110mM精氨酸，1.5%山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.0 20mg/mL	183±29	80±26	97±21	17±15	67±23	70±26	47±23	33±6	83±45	60±36	47±12	77±23	207±42	173±68	77±47
	133±29	60±10	63±21	7±6	40±17	43±21	37±25	27±15	60±35	20±10	37±15	37±6	137±55	110±62	57±29
	70±26	27±15	37±6	7±6	17±6	20±20	20±26	13±15	20±20	7±6	17±21	13±6	80±26	33±25	10±10
	23±15	13±6	13±6	3±6	7±6	7±6	13±15	0±0	10±10	0±0	10±10	0±0	20±0	10±10	0±0
	3±6	0±0	3±6	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
10mM 组氨酸，75mM精氨酸，3% 山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.3 20mg/mL	63±35	113±67	117±23	50±0	43±12	70±10	83±15	43±6	83±25	53±6	93±60	50±35	117±15	170±56	120±40
	40±20	67±42	73±12	30±10	27±12	40±10	63±6	23±6	60±10	33±6	83±60	37±31	87±25	120±26	77±15
	20±17	20±10	30±17	7±6	17±6	20±10	33±23	17±15	37±15	20±0	37±25	10±10	40±10	50±20	27±15
	10±10	7±6	7 ±2	0±0	10±0	3±6	20 ±10	3±6	17±21	7±6	7±12	3±6	20±10	23±15	10±0
	0±0	0±0	3±6	0±0	3±6	0±0	3±6	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
10mM 组氨酸，75mM精氨酸，3% 山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 50mg/mL	130±62	180±46	137±47	173±90	167±83	160±53	139±93	137±51	127±45	137±91	130±46	90±26	223±45	233±40	130±82
	73±25	113±67	103±35	113±55	123±25	113±45	93±65	100±53	93±23	93±51	107±40	57±15	163±40	153±29	113±72
	43±25	40±52	57±29	47±40	67±6	63±51	53±31	40±26	57±21	27±21	43±21	17±6	80±46	63±6	57±47
	10±10	3±6	27±15	10±10	30±10	17±15	20±17	13±12	13±6	7±6	17±12	7±6	13±6	20±10	10±0
	0±0	0±0	10±10	3±6	3±6	0±0	0±0	3±6	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

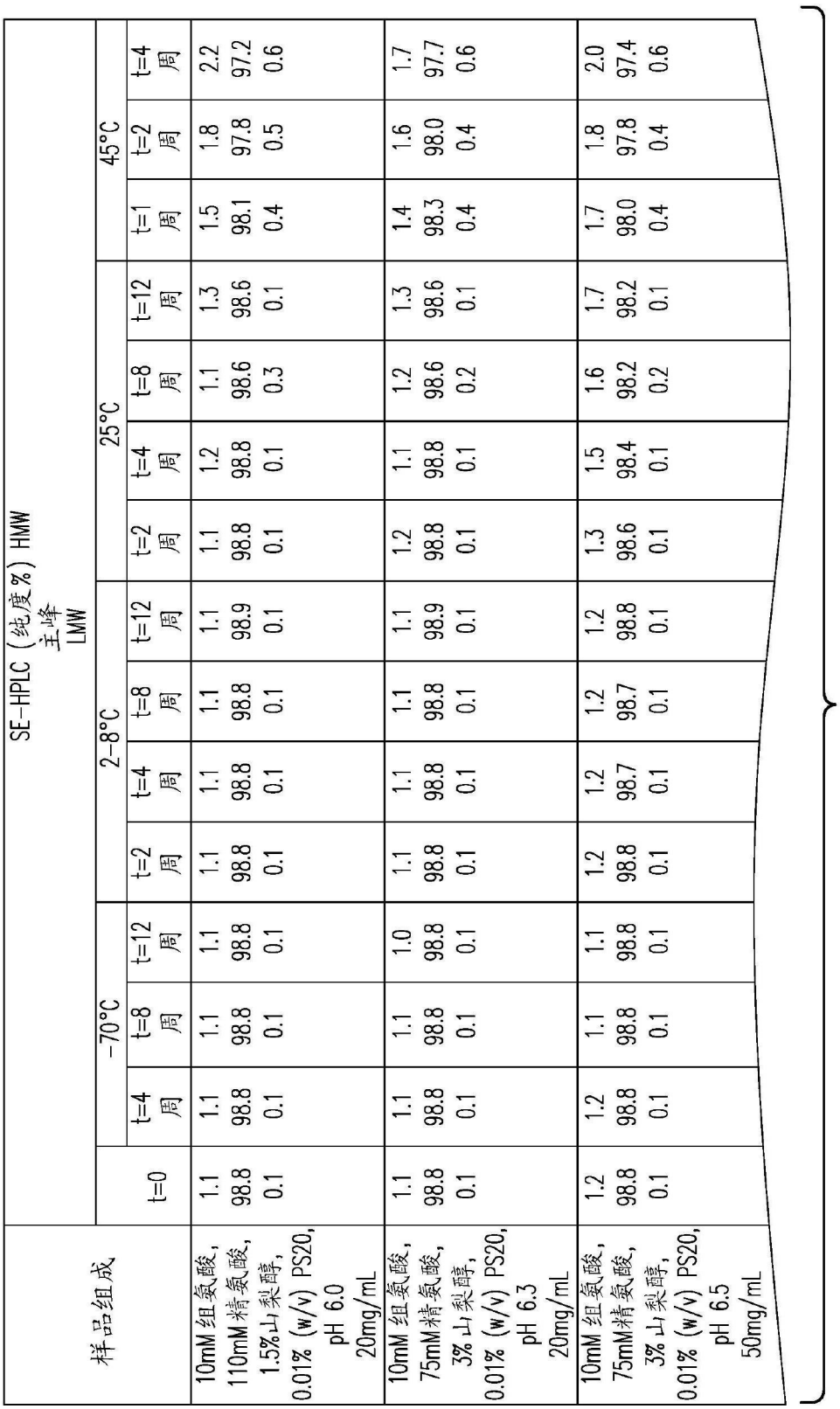
在图14B继续

图14A

从图14A继续

10mM组氨酸，75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20mg/mL	37±15	33±21	140±46	53±6	90±26	53±15	80±20	43±25	140±46	50±10	37±23	57±38	117±32	127±15	73±21
	30±10	37±23	100±26	30±10	70±20	30±20	67±25	17±12	127±47	17±15	23±15	47±31	77±23	77±15	47±15
	13±6	7±12	30±0	0±0	33±12	10±10	43±12	7±6	67±38	7±12	10±0	20±20	50±17	40±10	30±17
	3±6	0±0	7±6	0±0	13±15	3±6	17±12	0±0	27±6	3±6	7±6	3±6	17±12	17±15	7±6
	0±0	0±0	3±6	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	3±6	0±0	0±0	0±0
10mM组氨酸，55mM精氨酸，55mM谷氨酸，3%山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20mg/mL	67±29	120±69	153±64	293±64	83±31	93±45	30±0	60±30	60±20	47±40	77±25	67±6	93±50	113±35	97±50
	37±15	83±67	83±31	213±91	33±15	60±30	17±6	50±20	50±10	40±30	70±20	60±10	70±40	77±35	67±31
	23±15	47±64	27±6	97±32	20±10	20±10	3±6	20±20	33±6	20±26	47±25	37±6	33±15	40±26	27±15
	7±12	17±21	7±6	37±15	10±10	3±6	0±0	3±6	10±10	10±10	37±21	7±6	17±12	13±6	7±6
	0±0	7±6	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	7±6	0±0

图14B



样品组成	SE-HPLC（纯度%）HMW 主峰 LMW															
		-70°C			2-8°C			25°C				45°C				
	t=0	t=4周	t=8周	t=12周	t=2周	t=4周	t=8周	t=12周	t=2周	t=4周	t=8周	t=12周	t=1周	t=2周	t=4周
10mM组氨酸，110mM精氨酸，1.5%山梨醇，0.01%（w/v）PS20，pH 6.0 20mg/mL	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.3	1.5	1.8	2.2
	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.9	98.8	98.8	98.6	98.6	98.1	97.8	97.2
	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.4	0.5	0.6
10mM组氨酸，75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01%（w/v）PS20，pH 6.3 20mg/mL	1.1	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.3	1.4	1.6	1.7
	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.9	98.8	98.8	98.6	98.6	98.3	98.0	97.7
	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.4	0.6
10mM组氨酸，75mM精氨酸，3%山梨醇，0.01%（w/v）PS20，pH 6.5 50mg/mL	1.2	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.3	1.5	1.6	1.7	1.7	1.8	2.0
	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.7	98.7	98.8	98.6	98.4	98.2	98.2	98.0	97.8	97.4
	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.4	0.6

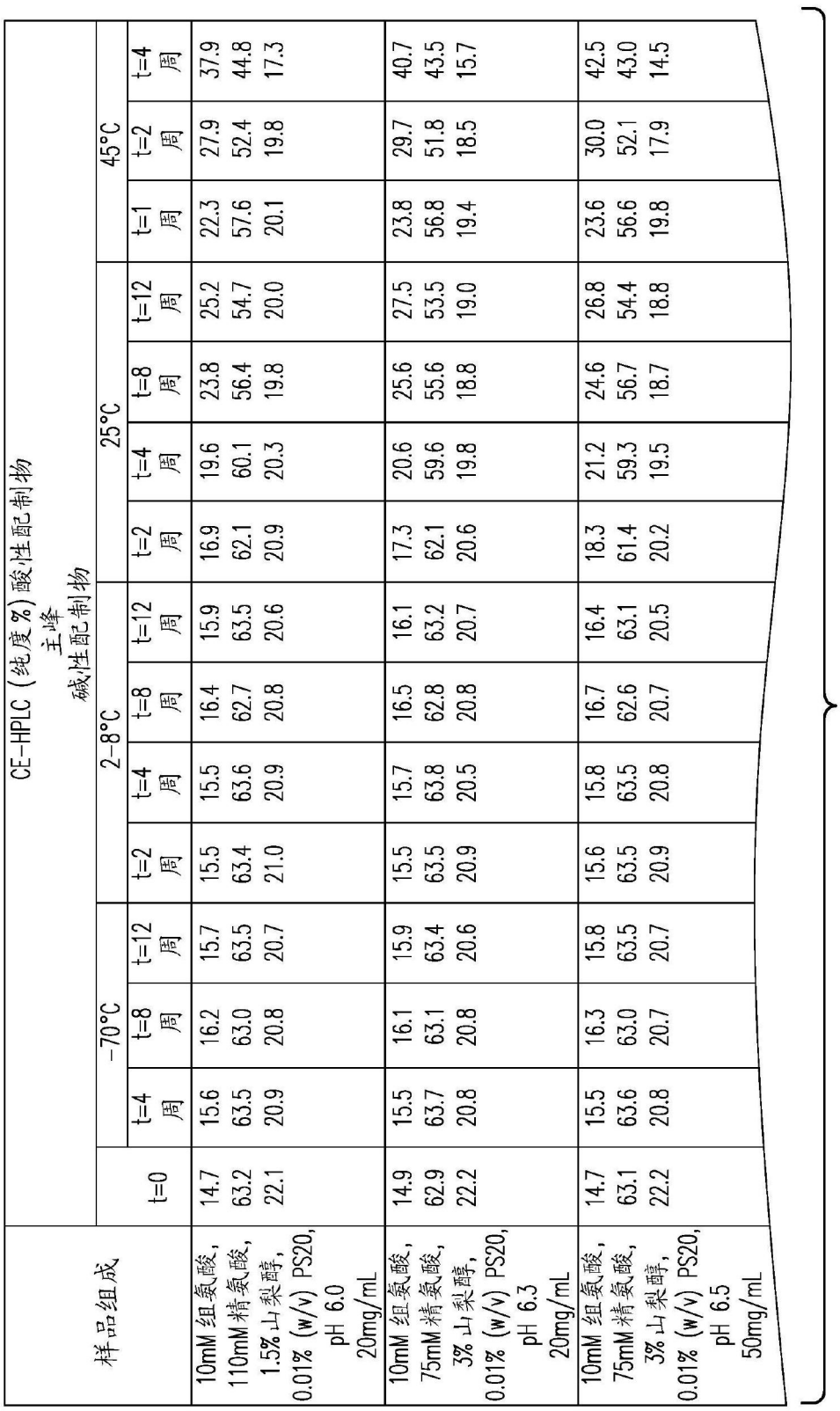
在图14B继续

图15A

从图15A继续

10mM 组氨酸，75mM精氨酸，3% 山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20mg/mL	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.2 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.2 98.8 0.1	1.2 98.8 0.1	1.5 98.4 0.1	1.4 98.3 0.3	1.5 98.2 0.3	1.7 97.7 0.6
10mM 组氨酸，55mM精氨酸，55mM谷氨酸，3% 山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20mg/mL	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.1 98.8 0.1	1.2 98.8 0.1	1.1 98.8 0.0	1.3 98.6 0.1	1.2 98.4 0.3	1.5 98.2 0.4	1.6 97.9 0.5

图15B



样品组成	CE-HPLC（纯度%）酸性配制物 主峰 碱性配制物														
		-70°C			2-8°C			25°C			45°C				
	t=0	t=4周	t=8周	t=12周	t=2周	t=4周	t=8周	t=12周	t=2周	t=4周	t=8周	t=12周	t=1周	t=2周	t=4周
10mM 组氨酸， 110mM 精氨酸， 1.5% 山梨醇， 0.01% (w/v) PS20， pH 6.0 20mg/mL	14.7	15.6	16.2	15.7	15.5	15.5	16.4	15.9	16.9	19.6	23.8	25.2	22.3	27.9	37.9
	63.2	63.5	63.0	63.5	63.4	63.6	62.7	63.5	62.1	60.1	56.4	54.7	57.6	52.4	44.8
	22.1	20.9	20.8	20.7	21.0	20.9	20.8	20.6	20.9	20.3	19.8	20.0	20.1	19.8	17.3
10mM 组氨酸， 75mM 精氨酸， 3% 山梨醇， 0.01% (w/v) PS20， pH 6.3 20mg/mL	14.9	15.5	16.1	15.9	15.5	15.7	16.5	16.1	17.3	20.6	25.6	27.5	23.8	29.7	40.7
	62.9	63.7	63.1	63.4	63.5	63.8	62.8	63.2	62.1	59.6	55.6	53.5	56.8	51.8	43.5
	22.2	20.8	20.8	20.6	20.9	20.5	20.8	20.7	20.6	19.8	18.8	19.0	19.4	18.5	15.7
10mM 组氨酸， 75mM 精氨酸， 3% 山梨醇， 0.01% (w/v) PS20， pH 6.5 50mg/mL	14.7	15.5	16.3	15.8	15.6	15.8	16.7	16.4	18.3	21.2	24.6	26.8	23.6	30.0	42.5
	63.1	63.6	63.0	63.5	63.5	63.5	62.6	63.1	61.4	59.3	56.7	54.4	56.6	52.1	43.0
	22.2	20.8	20.7	20.7	20.9	20.8	20.7	20.5	20.2	19.5	18.7	18.8	19.8	17.9	14.5

在图16B继续

图16A

从图16A继续

10mM 组氨酸，75mM精氨酸，3% 山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20mg/mL	15.0	15.5	16.3	15.8	15.7	15.6	16.9	16.5	18.1	22.8	28.8	31.3	26.1	32.3	44.7
	63.1	63.8	63.0	63.5	63.4	63.5	62.5	63.1	61.6	58.1	53.3	51.1	54.5	50.4	41.4
	21.9	20.7	20.8	20.7	20.9	20.9	20.7	20.4	20.4	19.1	17.9	17.6	19.4	17.3	13.9
10mM 组氨酸，55mM精氨酸，55mM谷氨酸，3% 山梨醇，0.01% (w/v) PS20，pH 6.5 20mg/mL	14.7	15.6	16.6	15.8	15.5	15.7	17.1	16.3	17.1	19.4	27.1	30.5	24.2	32.2	45.5
	63.4	63.6	62.7	63.6	63.7	63.5	62.3	63.2	62.4	60.9	55.0	52.0	56.4	50.9	41.2
	21.8	20.8	20.7	20.6	20.8	20.8	20.6	20.5	20.6	19.7	17.9	17.5	19.4	16.9	13.3

图16B

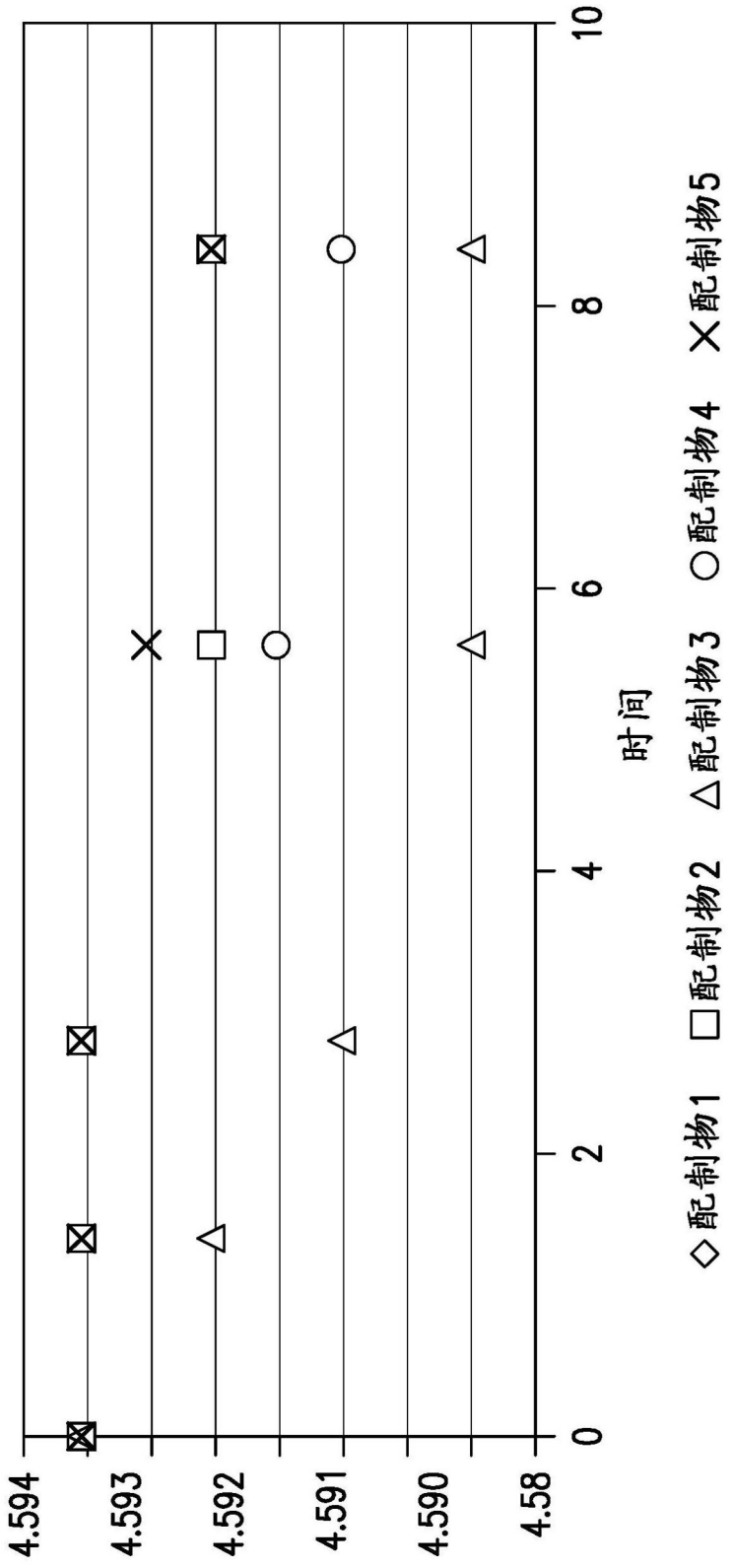

4.594
4.593
4.592
4.591
4.590
4.58
0
2
4
6
8
10
时间
◇配制物1
□配制物2
△配制物3
○配制物4
×配制物5

图17

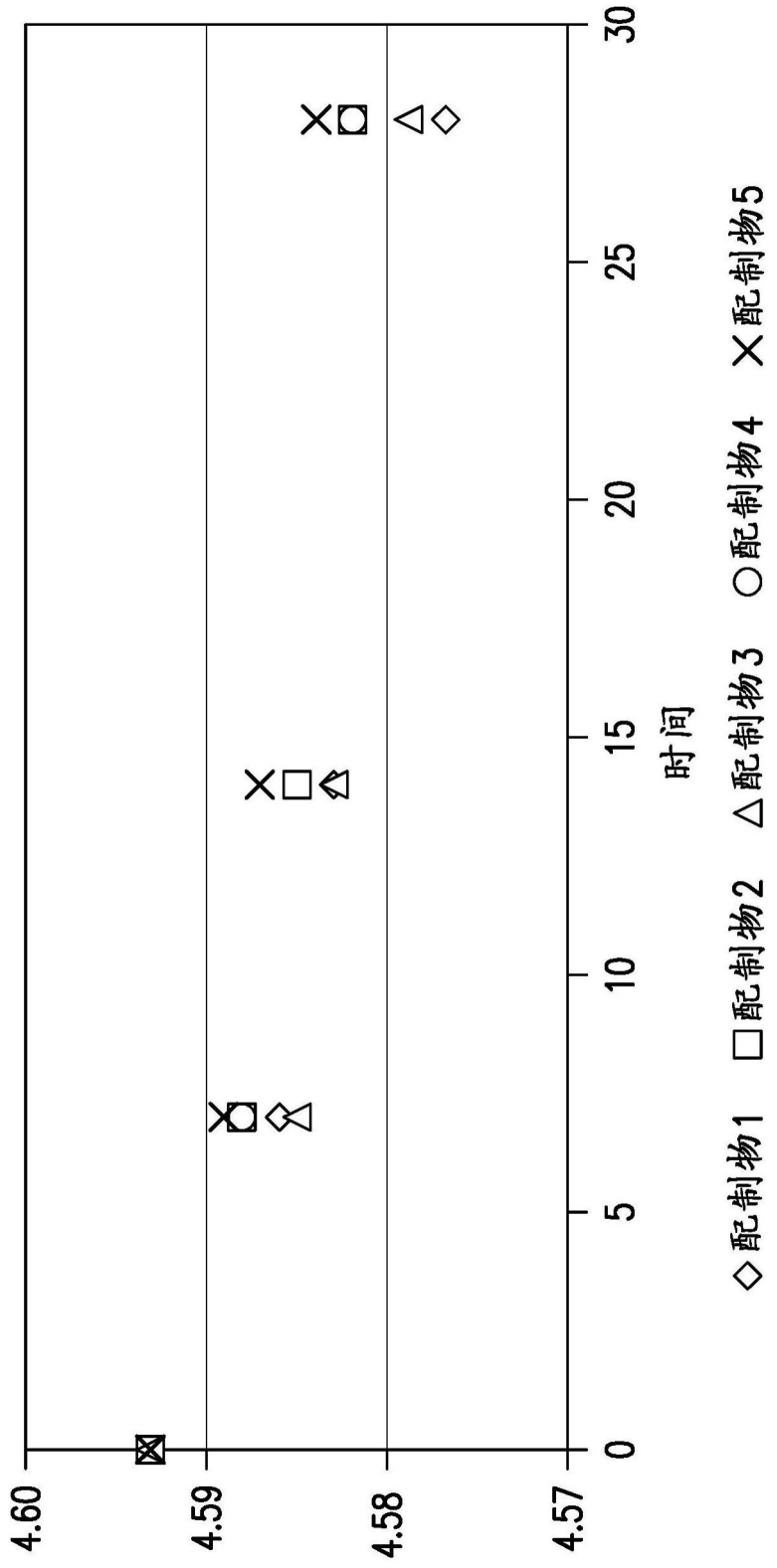


图18

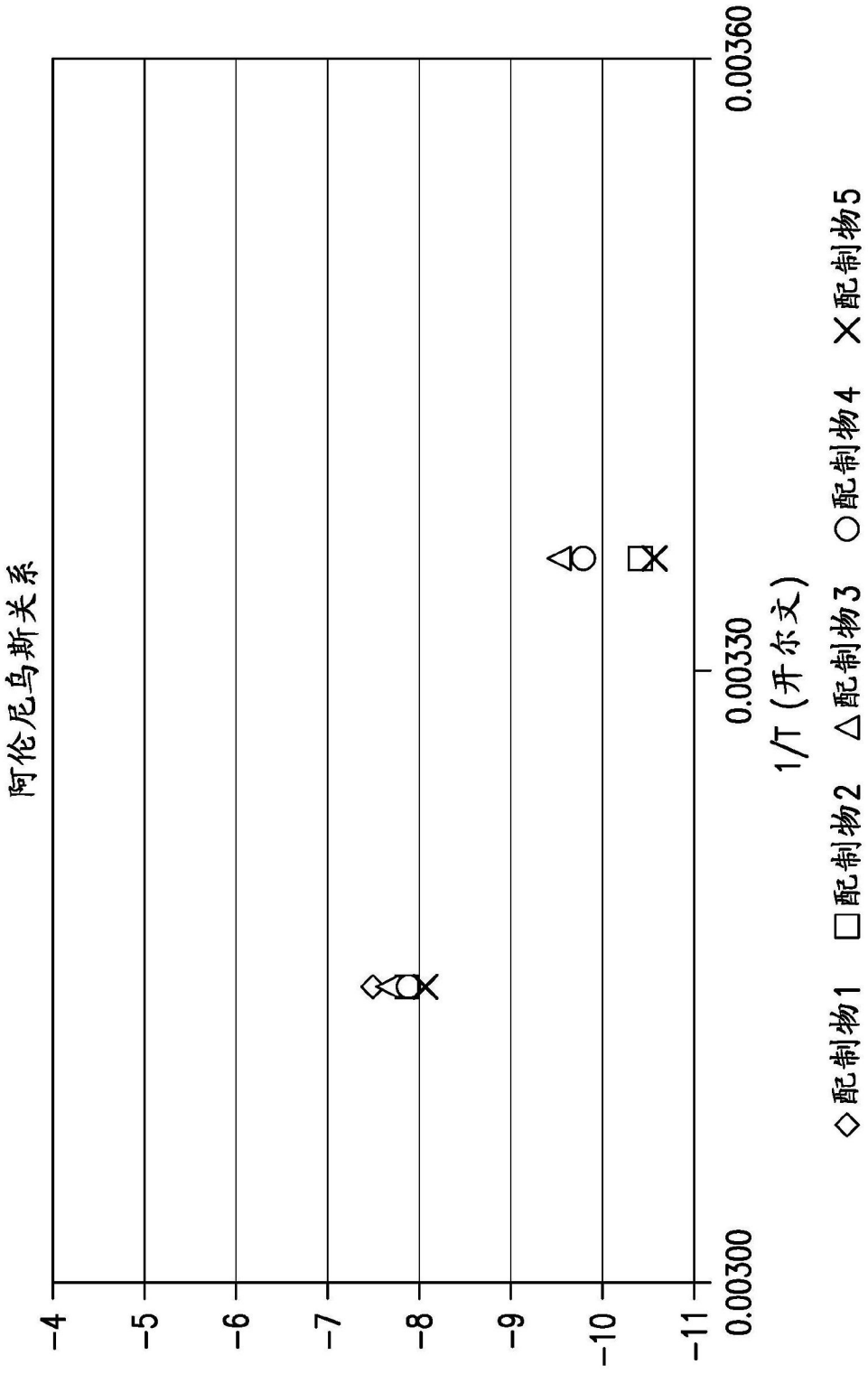

阿伦尼乌斯关系
-4
-5
-6
-7
-8
-9
-10
-11
0.00300
0.00330
0.00360
1/T (开尔文)
◇配制物1 □配制物2 △配制物3 ○配制物4 ×配制物5

图19

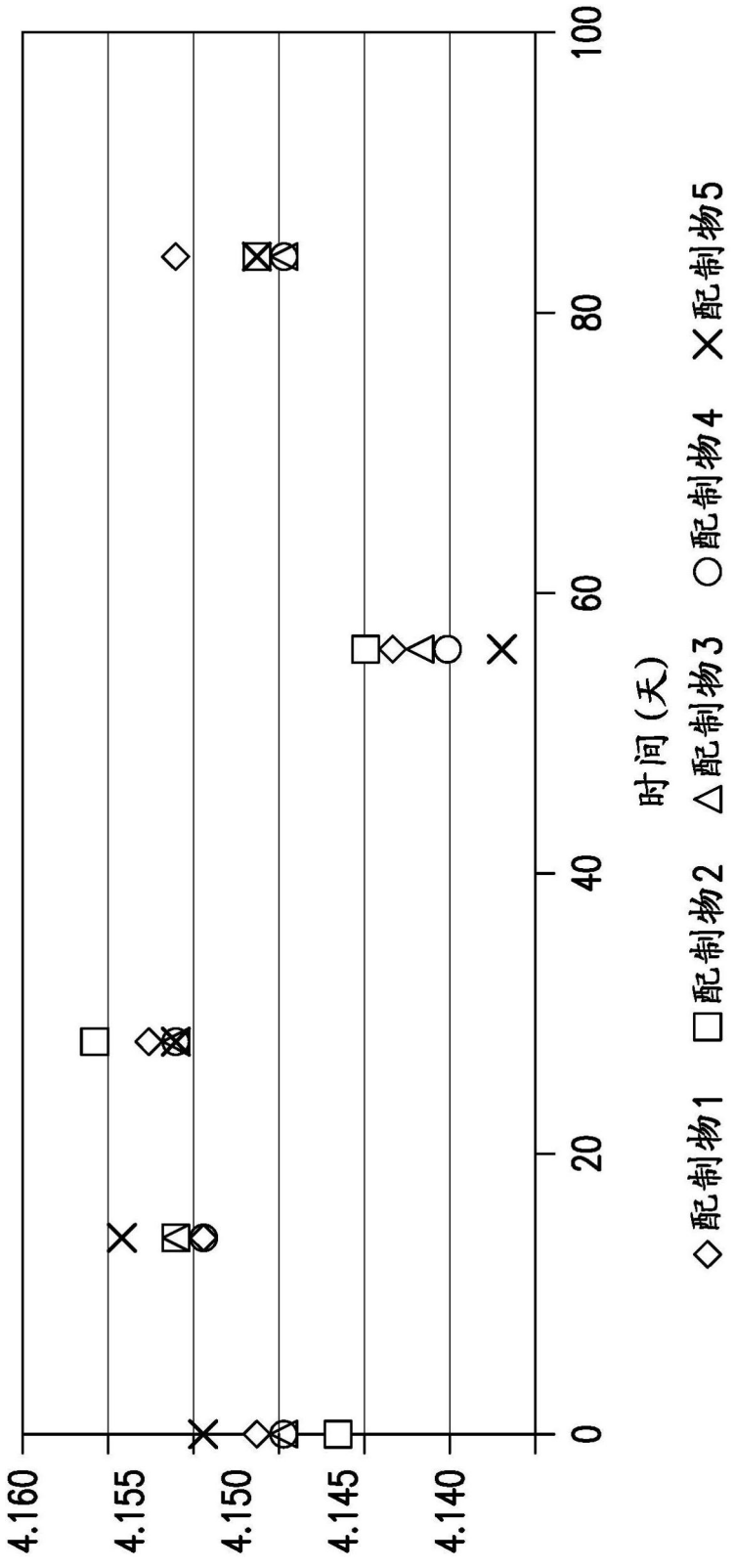

4.160
4.155
4.150
4.145
4.140
0
20
40
60
80
100
时间(天)
◇配制物1
□配制物2
△配制物3
○配制物4
×配制物5

图20

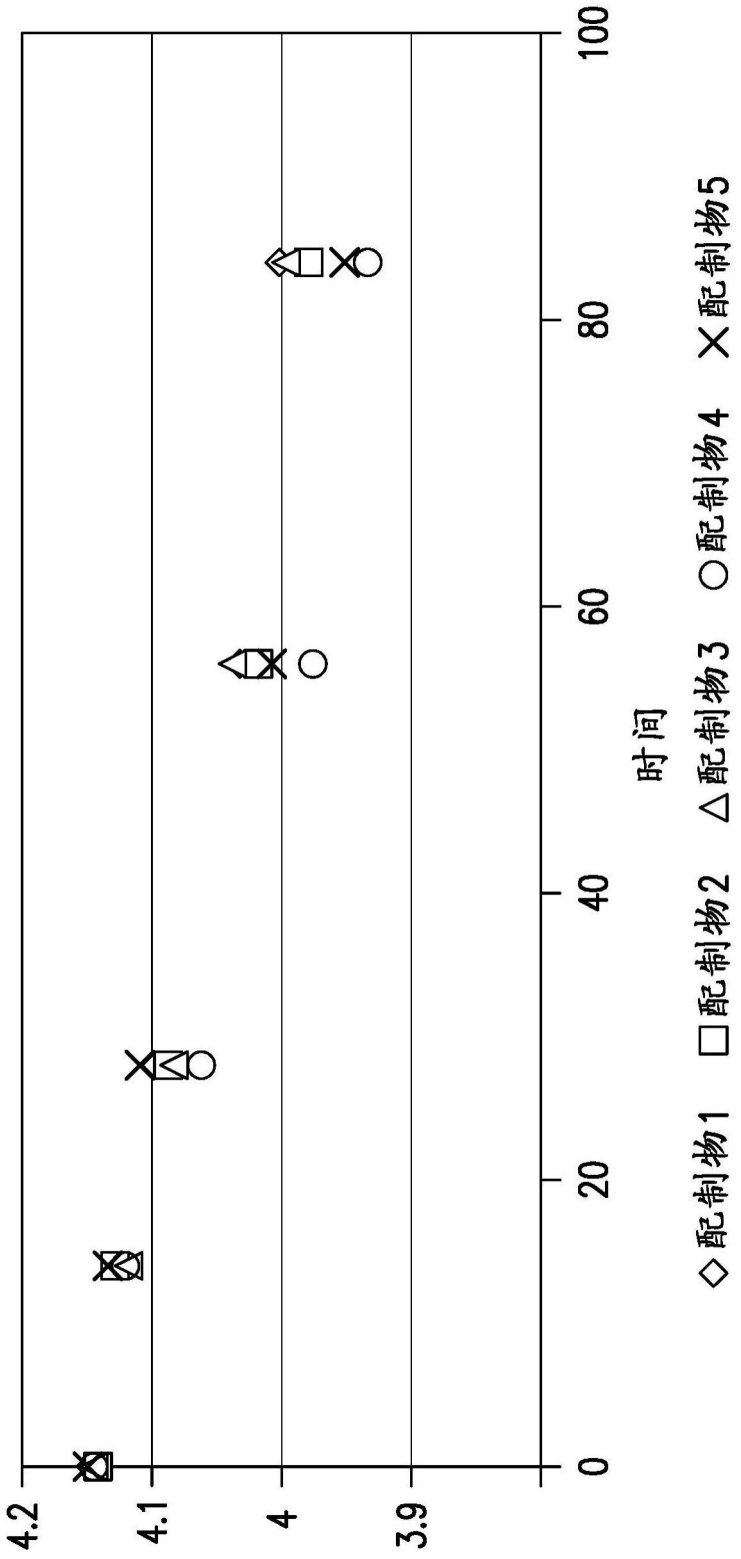


图21

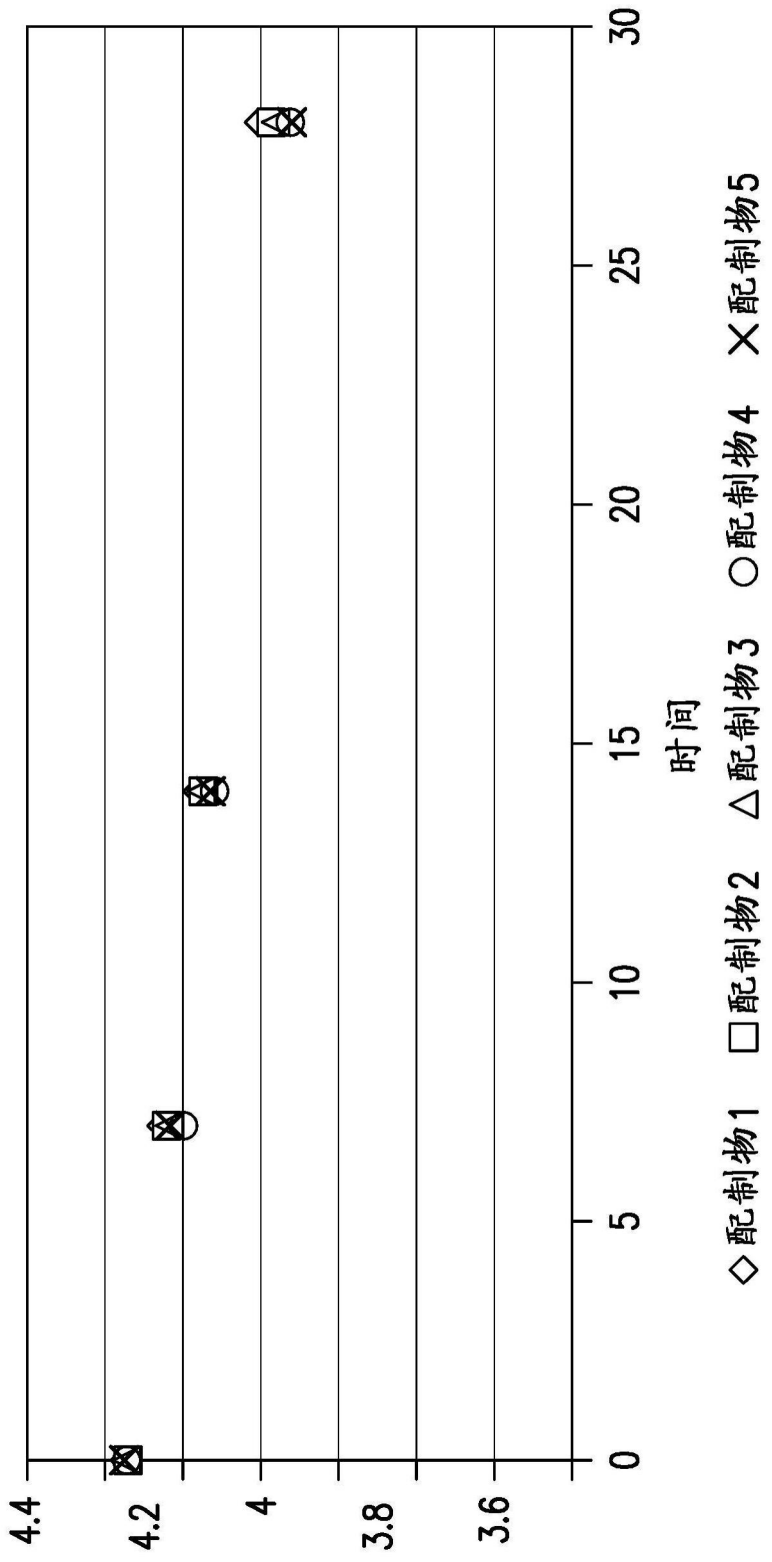


图22

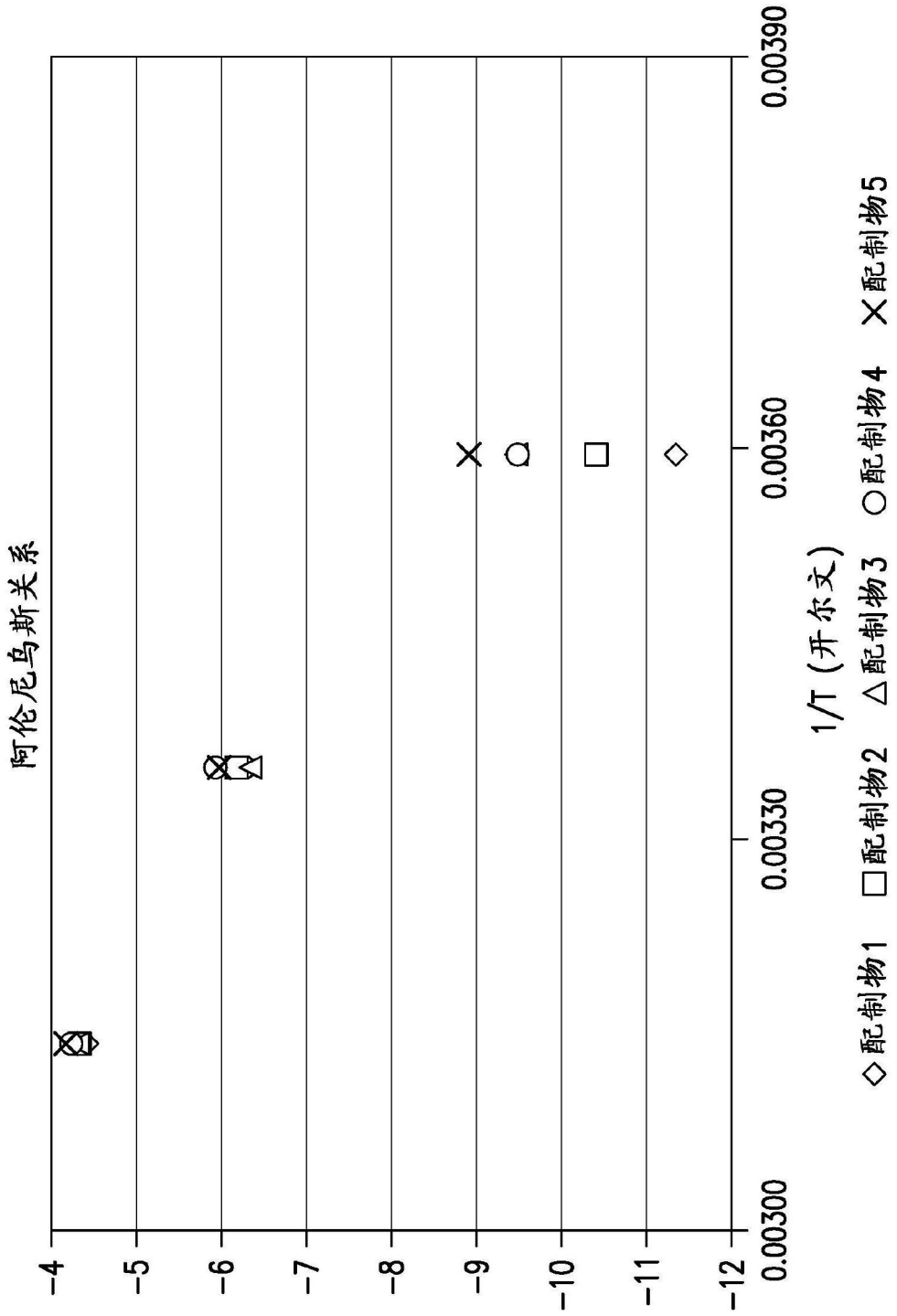

阿伦尼乌斯关系
-4
-5
-6
-7
-8
-9
-10
-11
-12
0.00300
0.00330
0.00360
0.00390
1/T (开尔文)
◇配制物1 □配制物2 △配制物3 ○配制物4 ×配制物5

图23

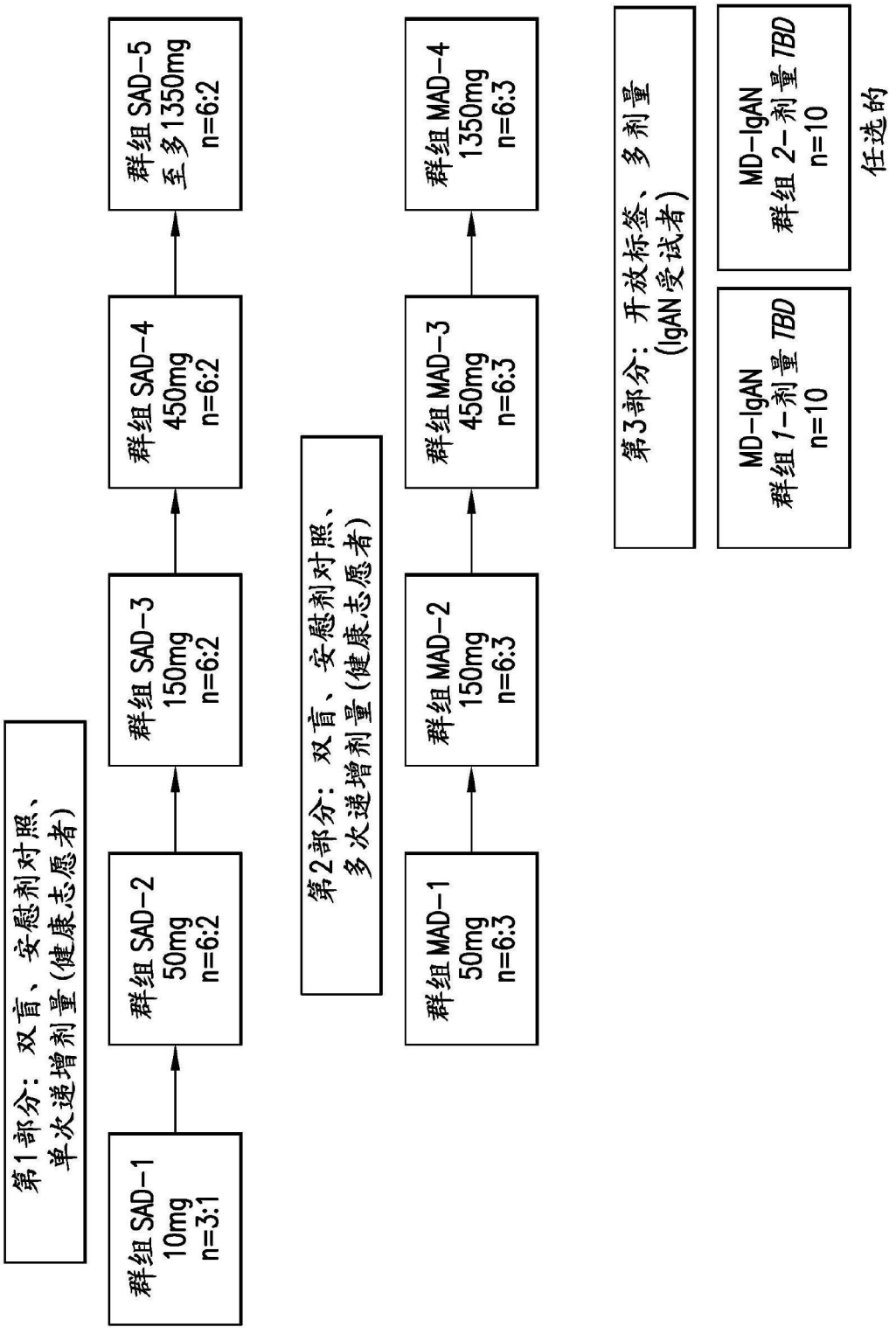

第1部分：双盲、安慰剂对照、
单次递增剂量(健康志愿者)
群组 SAD-1
10mg
n=3:1
群组 SAD-2
50mg
n=6:2
群组 SAD-3
150mg
n=6:2
群组 SAD-4
450mg
n=6:2
群组 SAD-5
至多1350mg
n=6:2
第2部分：双盲、安慰剂对照、
多次递增剂量(健康志愿者)
群组 MAD-1
50mg
n=6:3
群组 MAD-2
150mg
n=6:3
群组 MAD-3
450mg
n=6:3
群组 MAD-4
1350mg
n=6:3
第3部分：开放标签、多剂量
(IgAN受试者)
MD-IgAN
群组 1-剂量 TBD
n=10
MD-IgAN
群组 2-剂量 TBD
n=10
任选的

图24

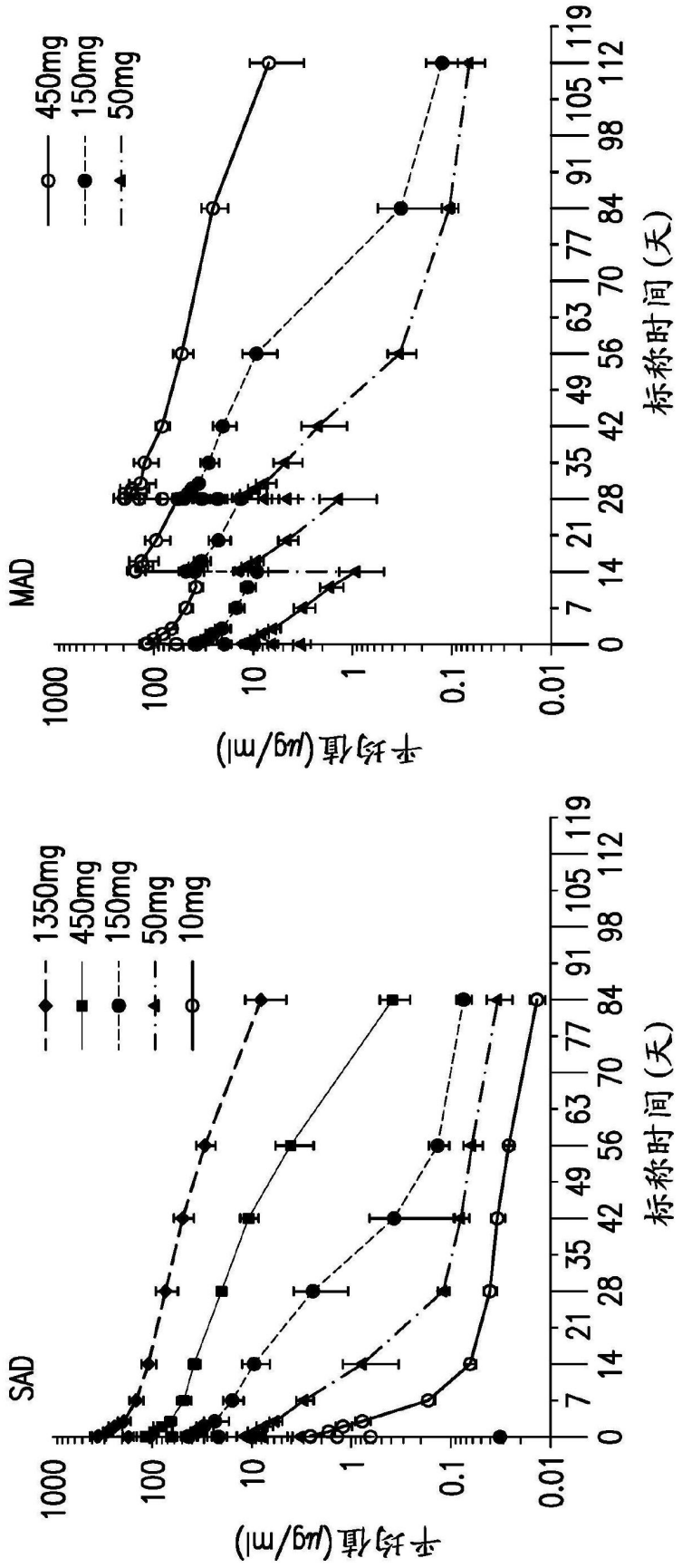

MAD
450mg
150mg
50mg
平均值(μg/ml)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
84
91
98
105
112
119
标称时间(天)
SAD
1350mg
450mg
150mg
50mg
10mg
平均值(μg/ml)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
84
91
98
105
112
119
标称时间(天)

图25

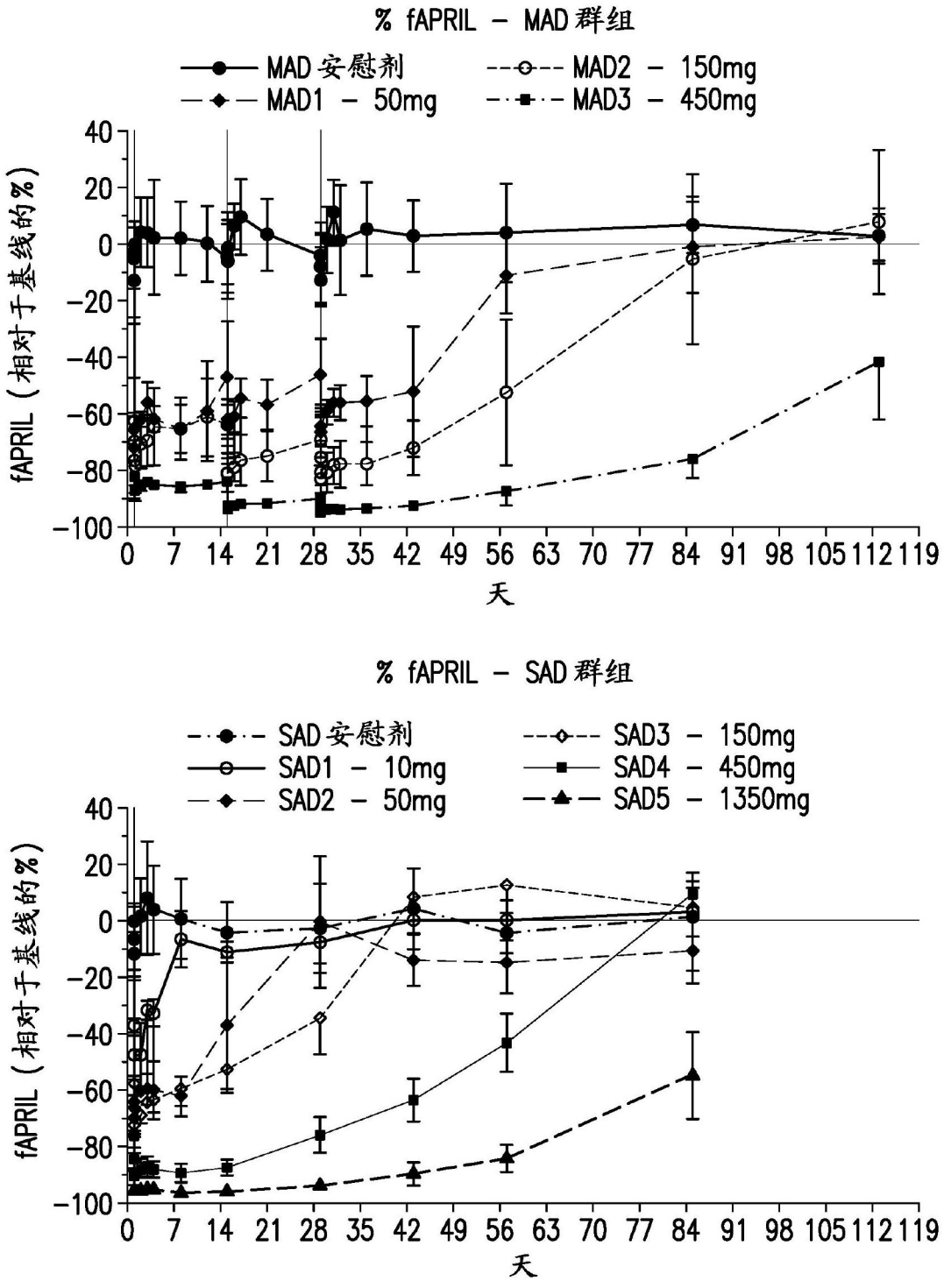

% fAPRIL – MAD 群组
MAD 安慰剂
MAD1 – 50mg
MAD2 – 150mg
MAD3 – 450mg
fAPRIL（相对于基线的%）
40
20
0
−20
−40
−60
−80
−100
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112 119
天
% fAPRIL – SAD 群组
SAD 安慰剂
SAD1 – 10mg
SAD2 – 50mg
SAD3 – 150mg
SAD4 – 450mg
SAD5 – 1350mg
fAPRIL（相对于基线的%）
40
20
0
−20
−40
−60
−80
−100
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112 119
天

图26

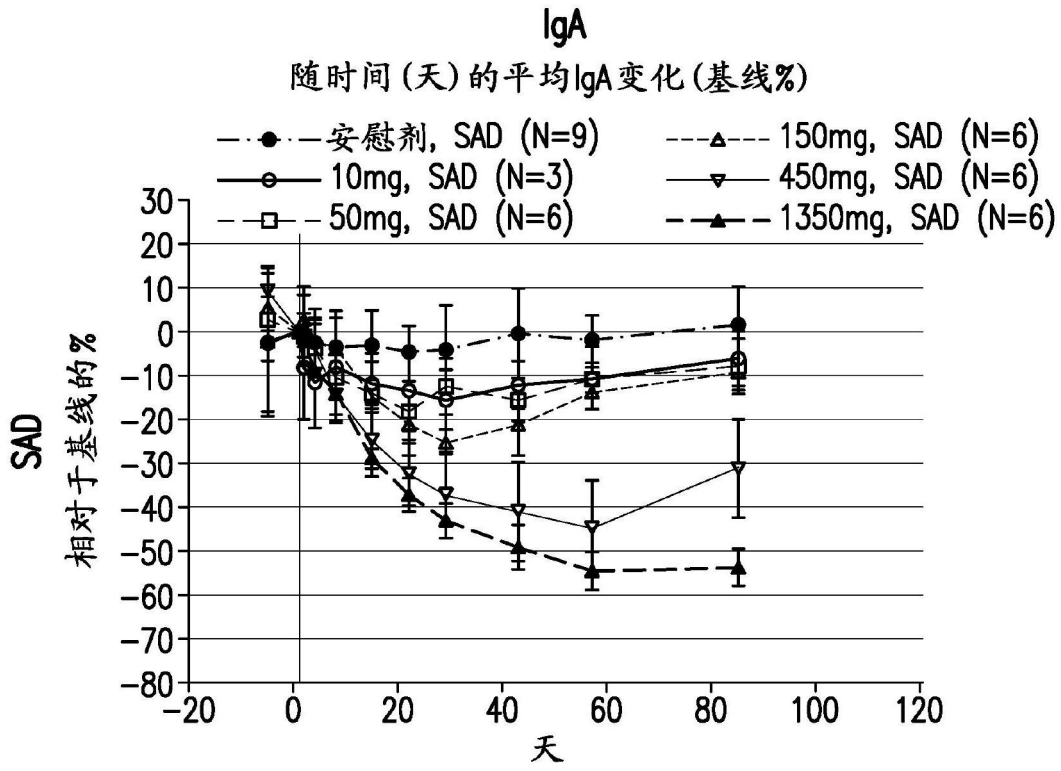

IgA
随时间(天)的平均IgA变化(基线%)
安慰剂, SAD (N=9)
10mg, SAD (N=3)
50mg, SAD (N=6)
150mg, SAD (N=6)
450mg, SAD (N=6)
1350mg, SAD (N=6)
SAD
相对于基线的%
天

图27A

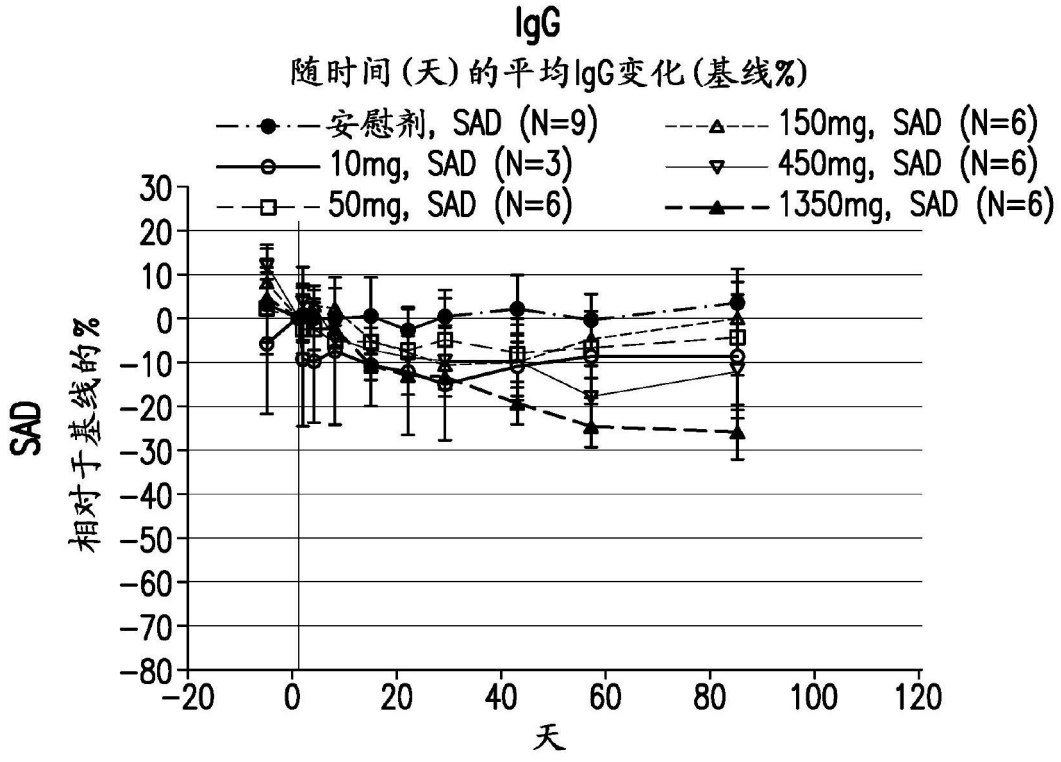

IgG
随时间(天)的平均IgG变化(基线%)
安慰剂, SAD (N=9)
10mg, SAD (N=3)
50mg, SAD (N=6)
150mg, SAD (N=6)
450mg, SAD (N=6)
1350mg, SAD (N=6)
SAD
相对于基线的%
天

图27B

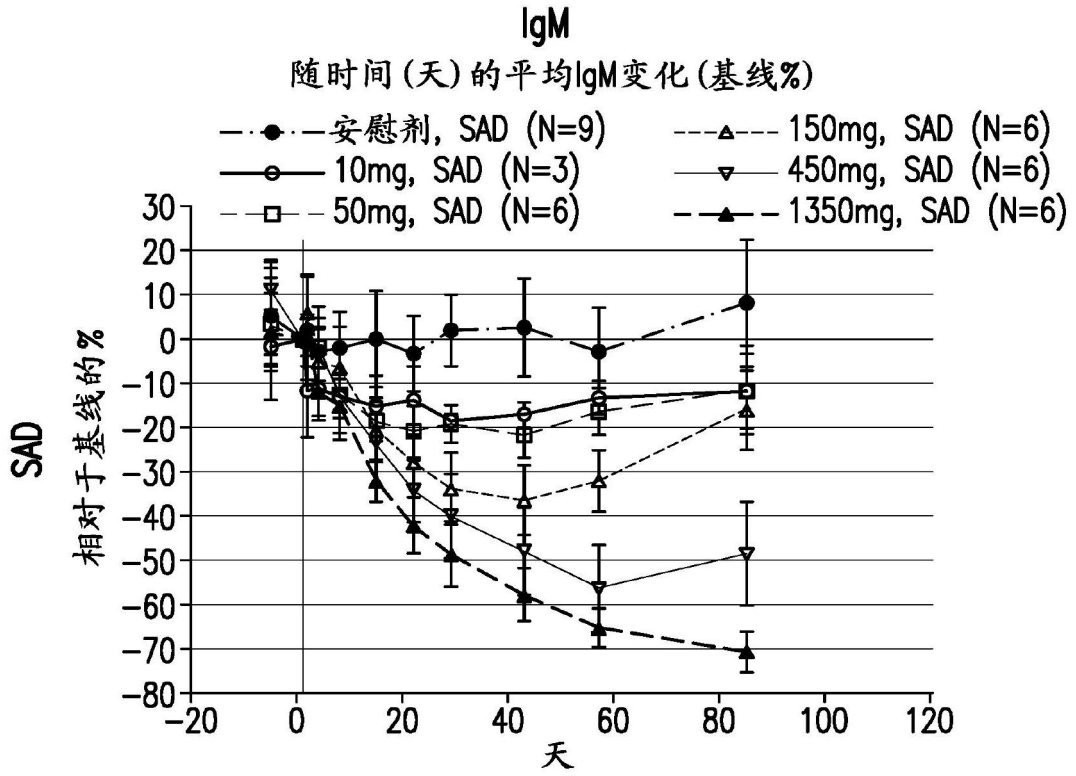

IgM
随时间(天)的平均IgM变化(基线%)
安慰剂, SAD (N=9)
150mg, SAD (N=6)
10mg, SAD (N=3)
450mg, SAD (N=6)
50mg, SAD (N=6)
1350mg, SAD (N=6)
SAD
相对于基线的%
天

图27C

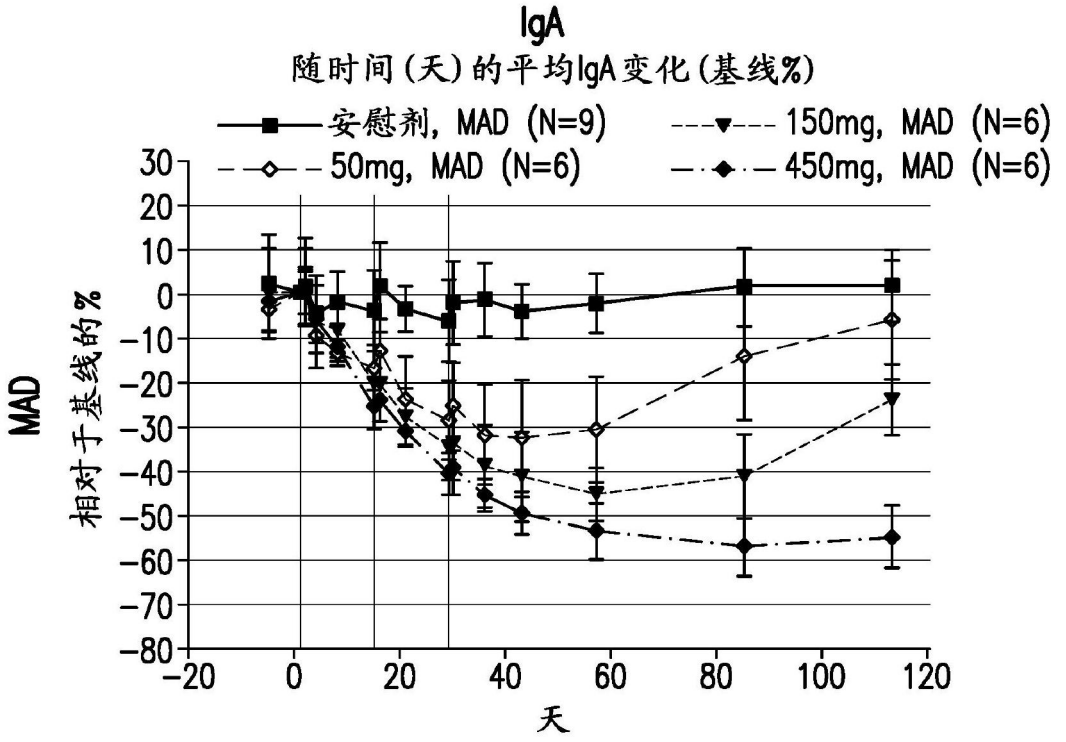

IgA
随时间(天)的平均IgA变化(基线%)
安慰剂, MAD (N=9)
150mg, MAD (N=6)
50mg, MAD (N=6)
450mg, MAD (N=6)
MAD
相对于基线的%
天

图27D

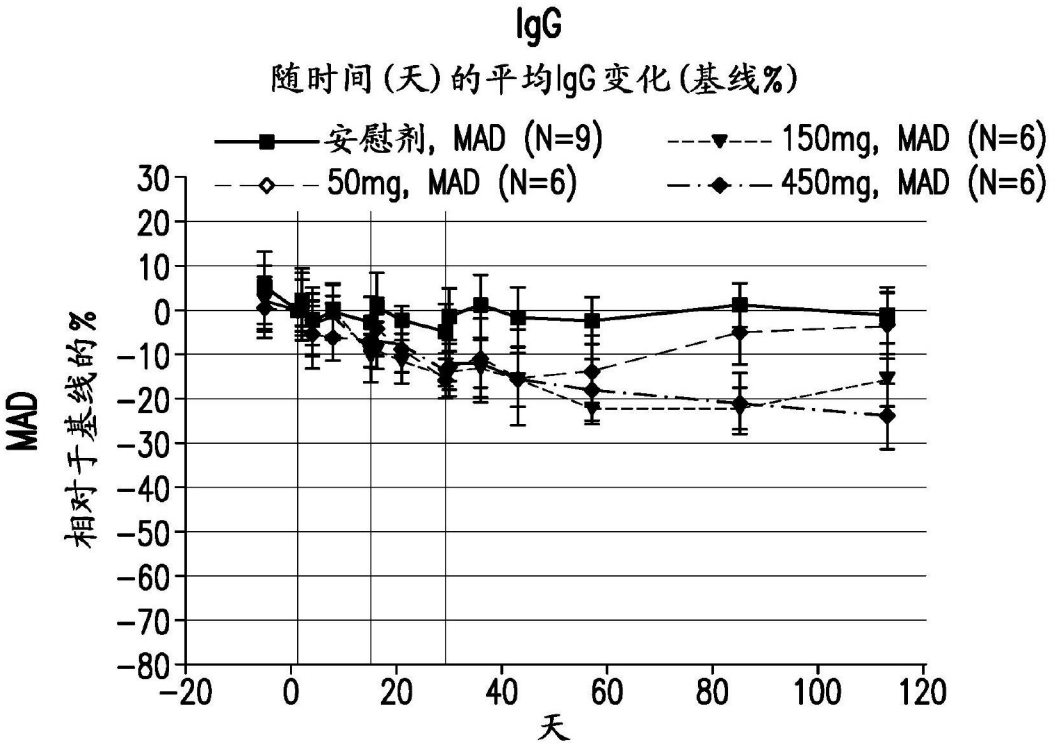

IgG
随时间(天)的平均IgG变化(基线%)
安慰剂, MAD (N=9)
150mg, MAD (N=6)
50mg, MAD (N=6)
450mg, MAD (N=6)
MAD
相对于基线的%
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-20
0
20
40
60
80
100
120
天

图27E

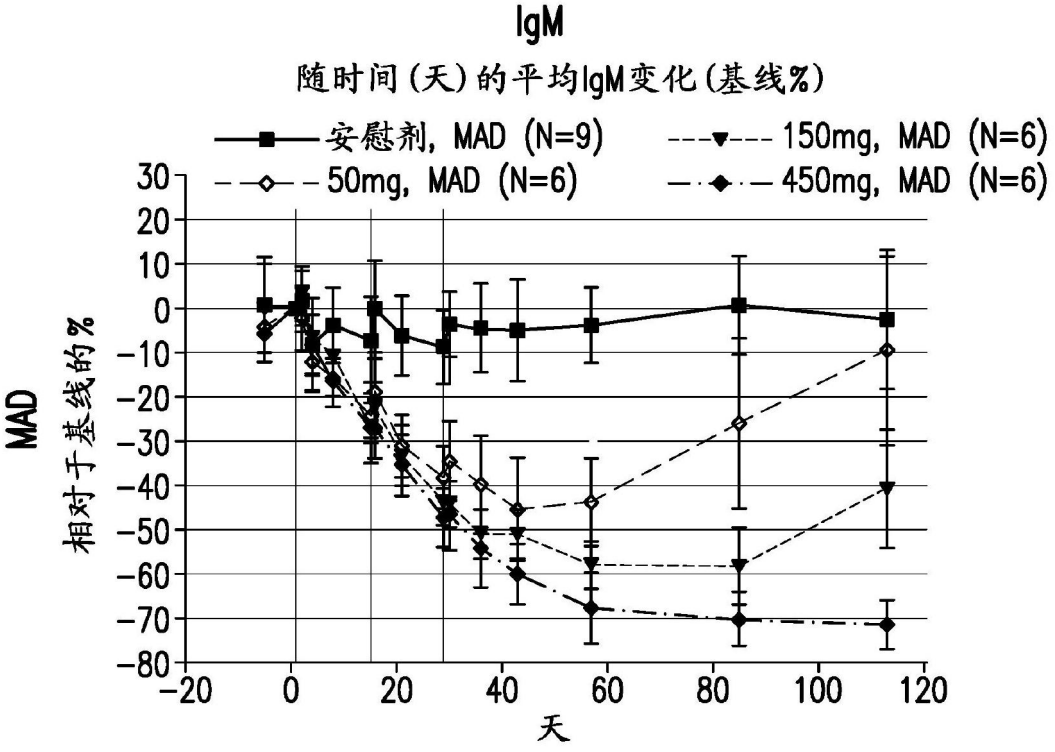

IgM
随时间(天)的平均IgM变化(基线%)
安慰剂, MAD (N=9)
150mg, MAD (N=6)
50mg, MAD (N=6)
450mg, MAD (N=6)
MAD
相对于基线的%
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-20
0
20
40
60
80
100
120
天

图27F

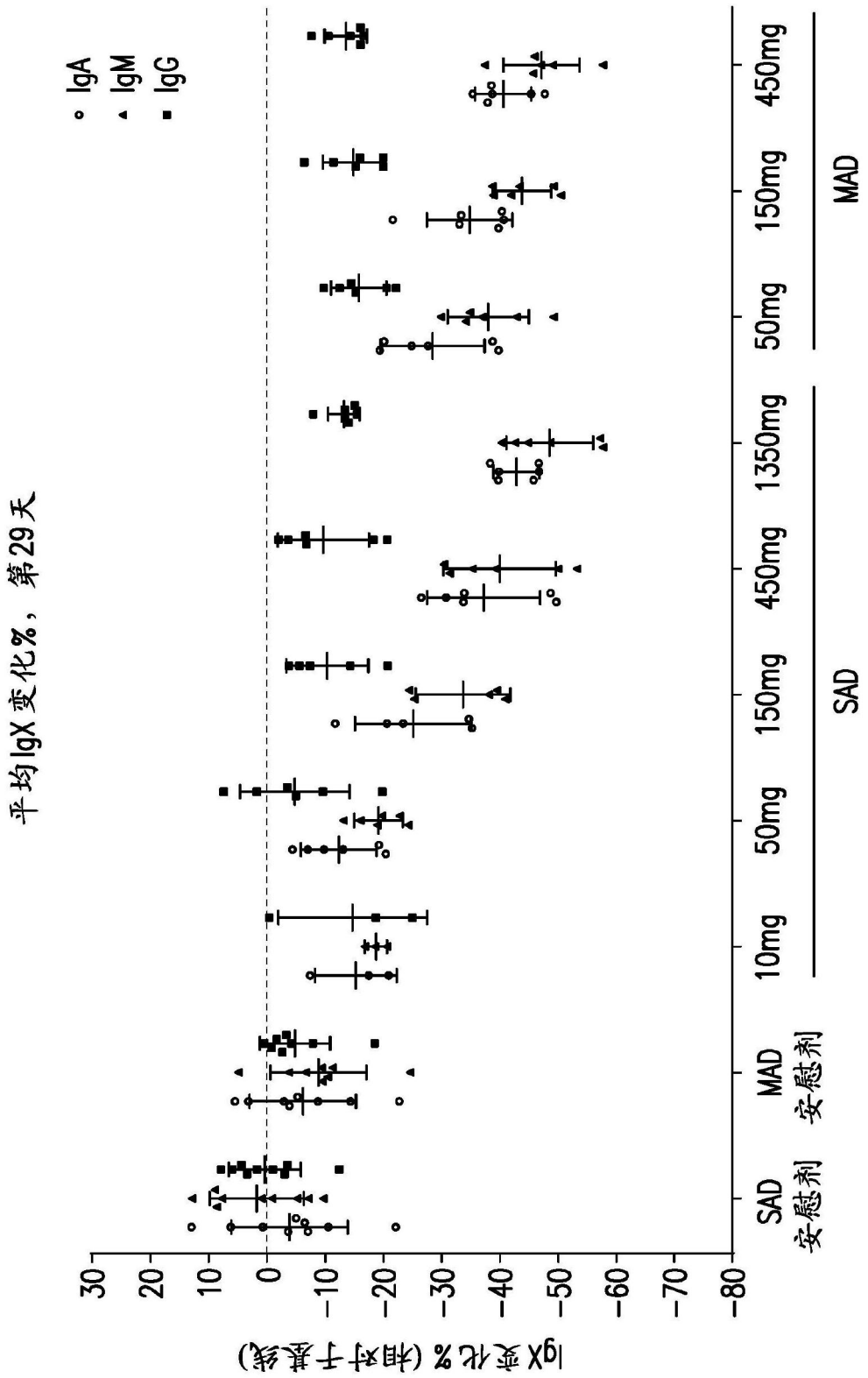

平均IgX变化%，第29天
IgA
IgM
IgG
IgX变化% (相对于基线)
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
SAD
安慰剂
10mg
50mg
150mg
450mg
1350mg
MAD
安慰剂
50mg
150mg
450mg
MAD

图28A

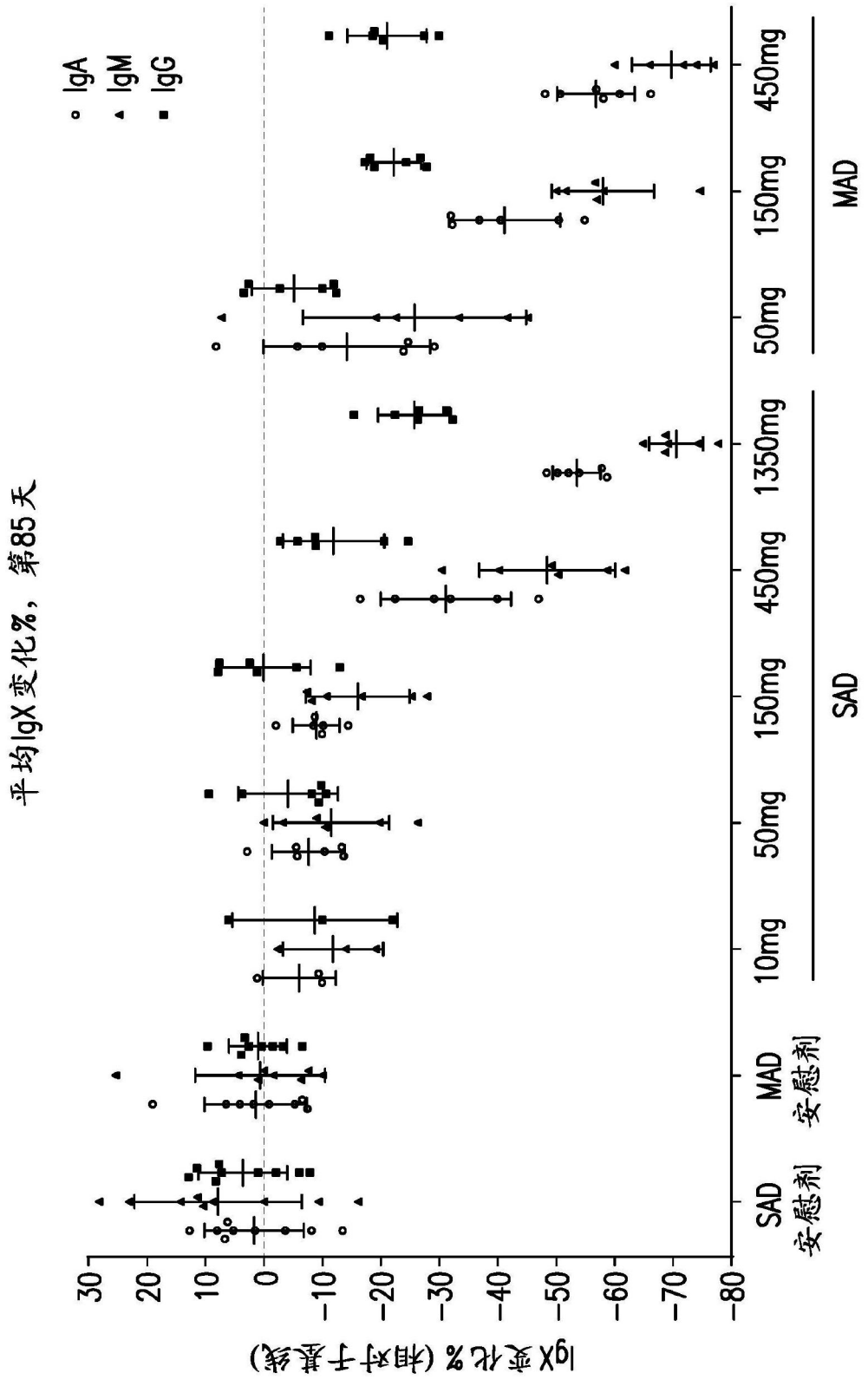

平均IgX变化%，第85天
IgX变化% (相对于基线)
IgA
IgM
IgG
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
SAD
MAD
安慰剂
10mg
50mg
150mg
450mg
1350mg
安慰剂
50mg
150mg
450mg
SAD
MAD

图28B

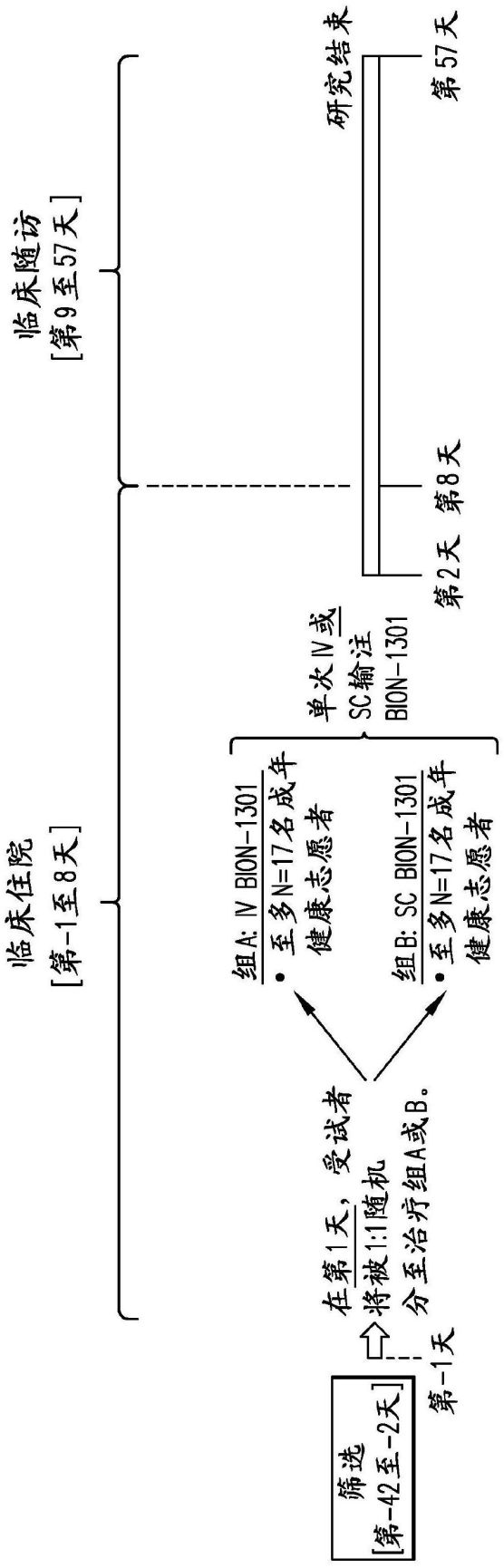

筛选
[第-42至-2天]
第-1天
在第1天，受试者
将被1:1随机
分至治疗组A或B。
组A: IV BION-1301
• 至多N=17名成年
健康志愿者
组B: SC BION-1301
• 至多N=17名成年
健康志愿者
单次IV或
SC输注
BION-1301
第2天
第8天
研究结束
第57天
临床住院
[第-1至8天]
临床随访
[第9至57天]

图29

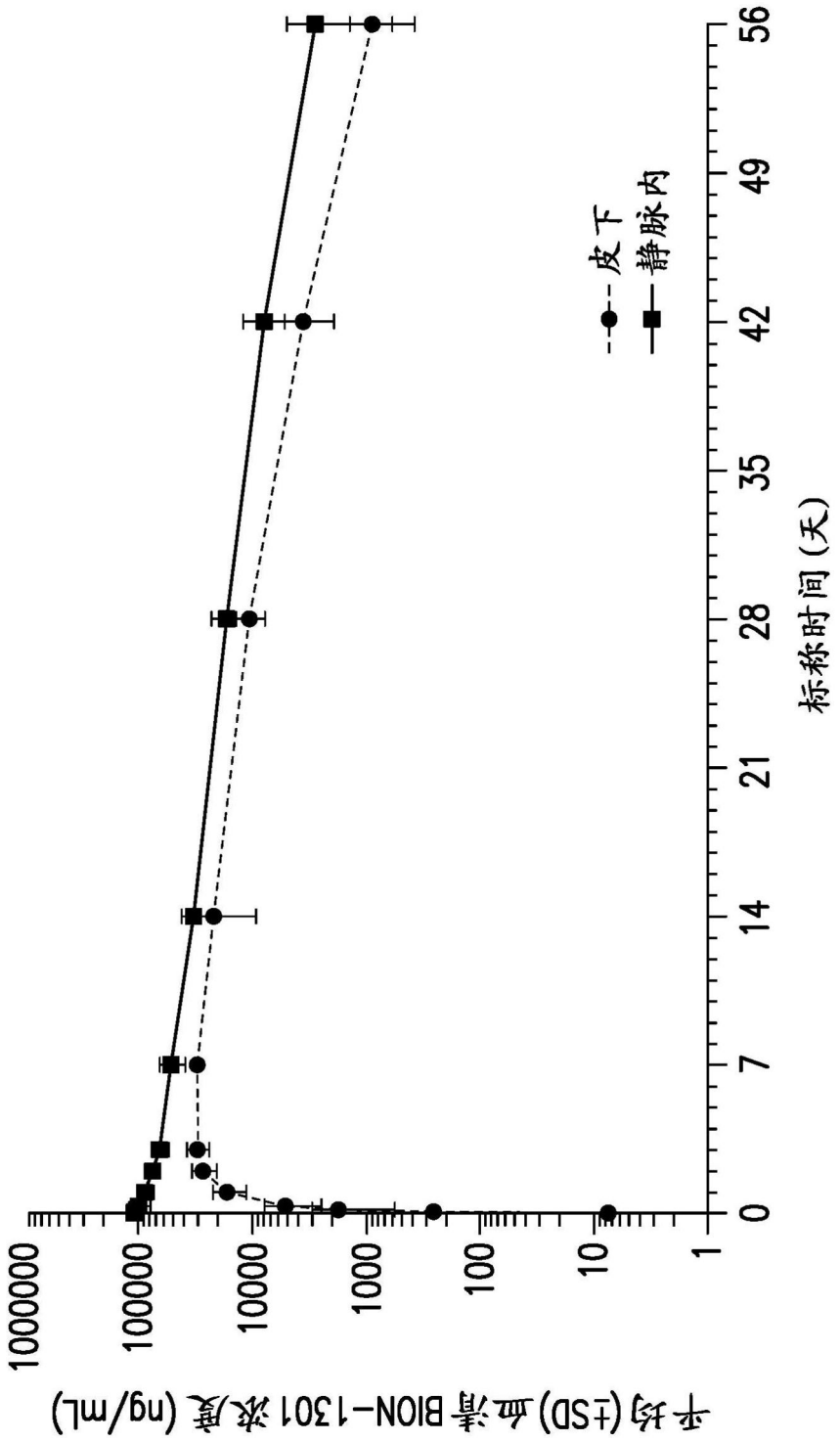

平均(±SD)血清BION-1301浓度(ng/mL)
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
49
56
标称时间(天)
皮下
静脉内

图30

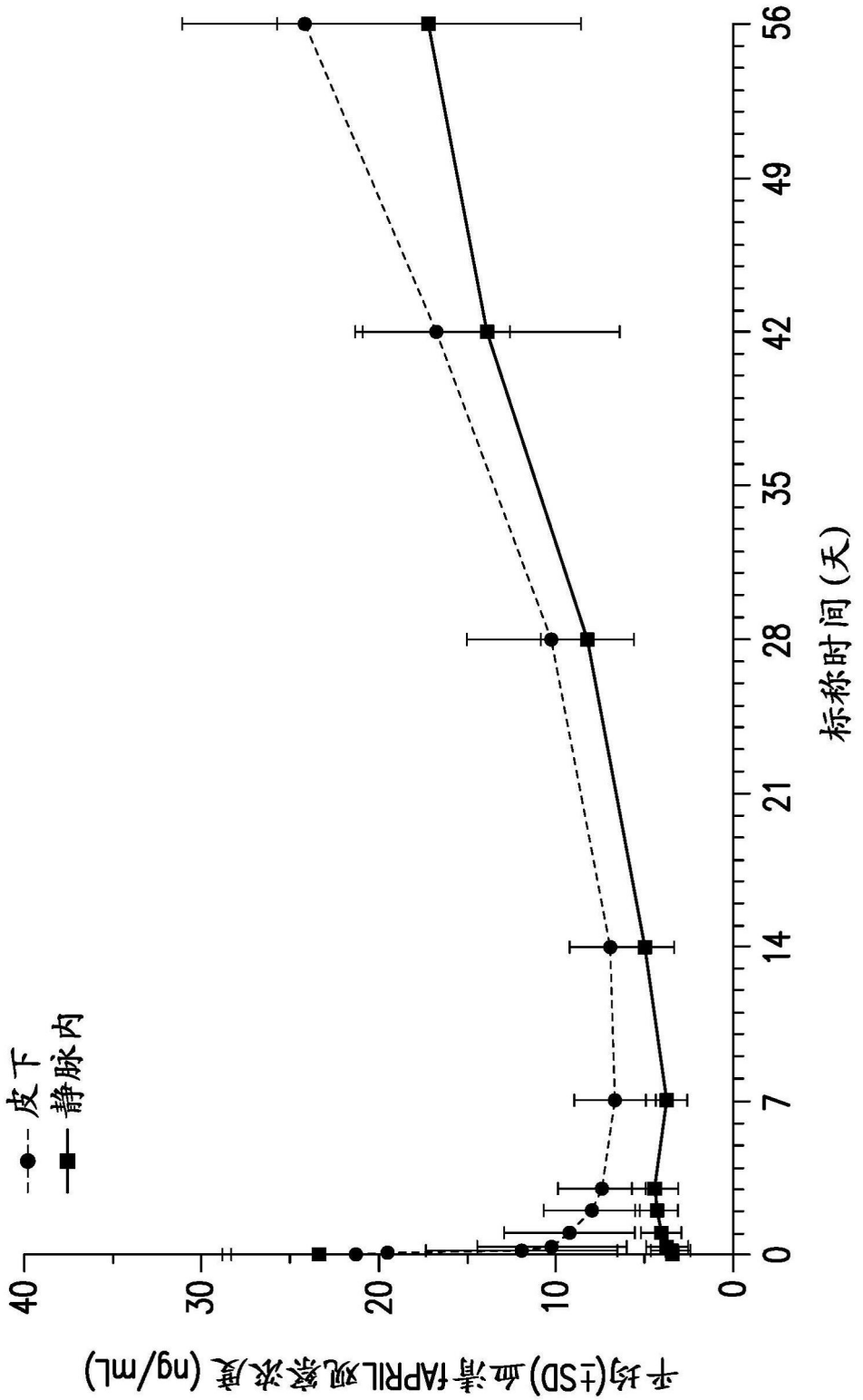

平均(±SD)血清sAPRIL观察浓度 (ng/mL)
0
10
20
30
40
0
7
14
21
28
35
42
49
56
标称时间(天)
皮下
静脉内

图31A

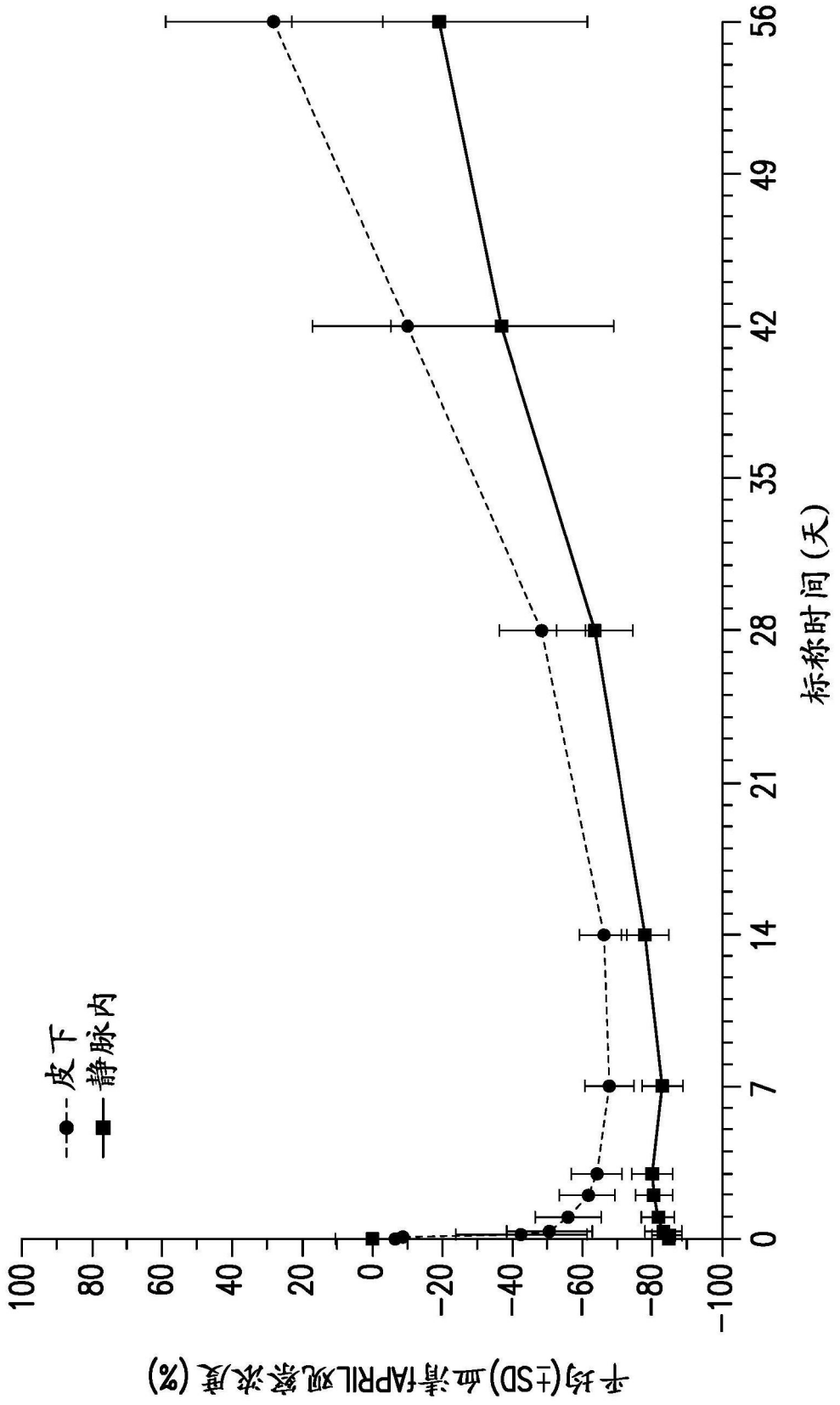

平均(±SD)血清tAPRIL观察浓度(%)
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0
7
14
21
28
35
42
49
56
标称时间(天)
皮下
静脉内

图31B

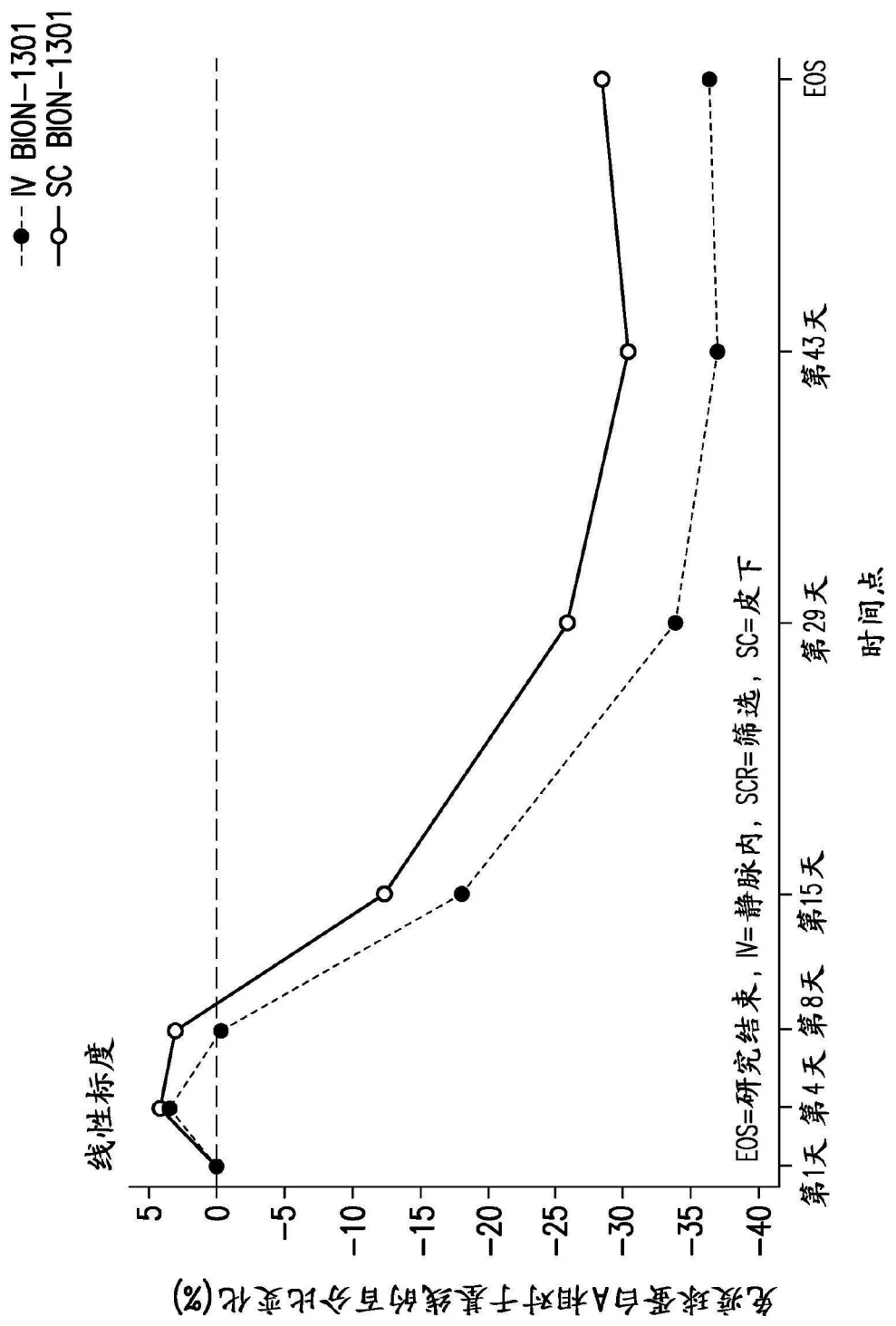

IV BION-1301
SC BION-1301
线性标度
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
-40
免疫球蛋白A相对于基线的百分比变化(%)
EOS=研究结束，IV=静脉内，SCR=筛选，SC=皮下
第1天 第4天 第8天 第15天 第29天 第43天 EOS
时间点

图32A

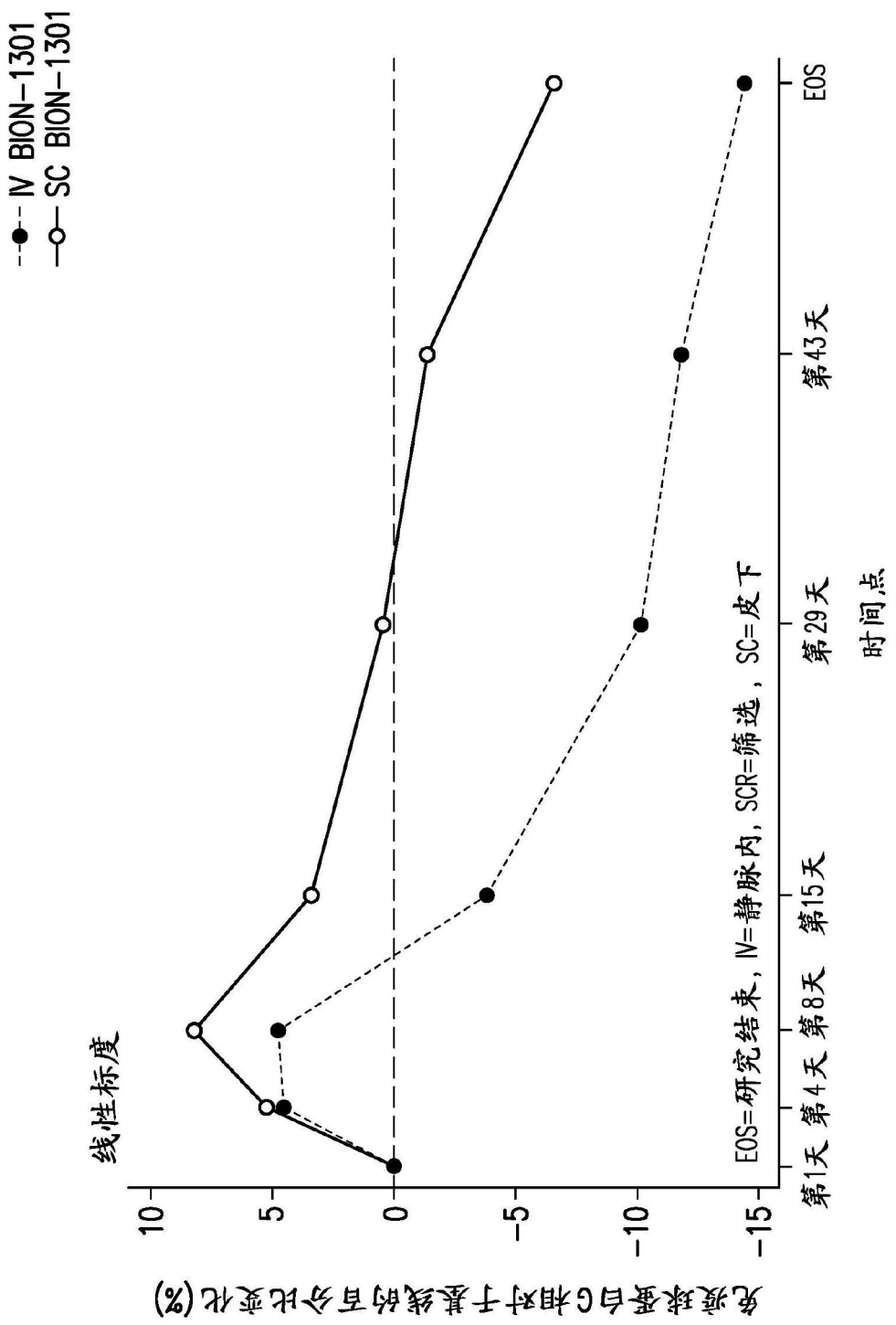

IV BION-1301
SC BION-1301
线性标度
10
5
0
-5
-10
-15
免疫球蛋白G相对于基线的百分比变化(%)
EOS=研究结束，IV=静脉内，SCR=筛选，SC=皮下
第1天 第4天 第8天 第15天 第29天 第43天 EOS
时间点

图32B

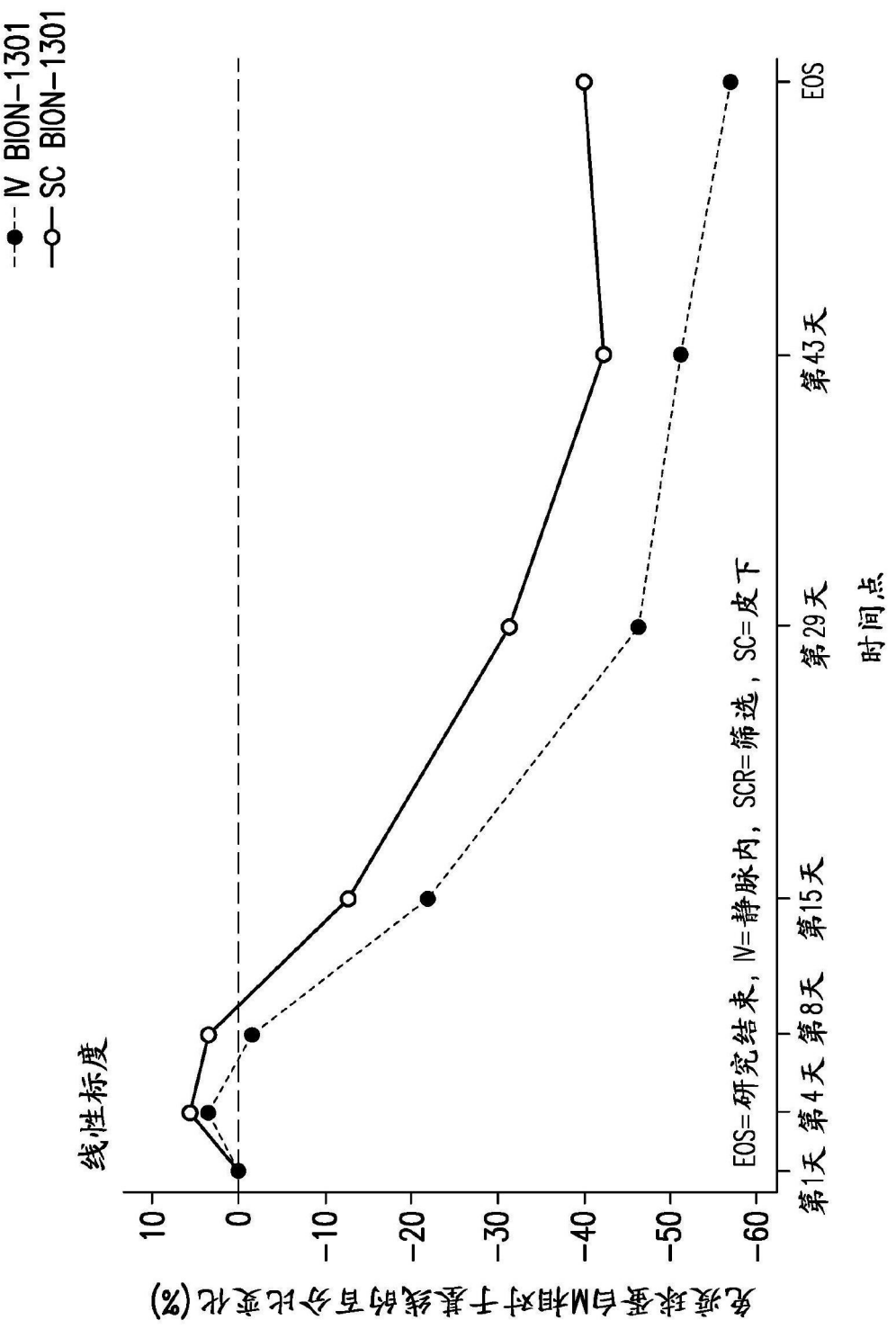

IV BION-1301
SC BION-1301
线性标度
免疫球蛋白M相对于基线的百分比变化(%)
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
EOS=研究结束，IV=静脉内，SCR=筛选，SC=皮下
第1天 第4天 第8天 第15天 第29天 第43天 EOS
时间点

图32C

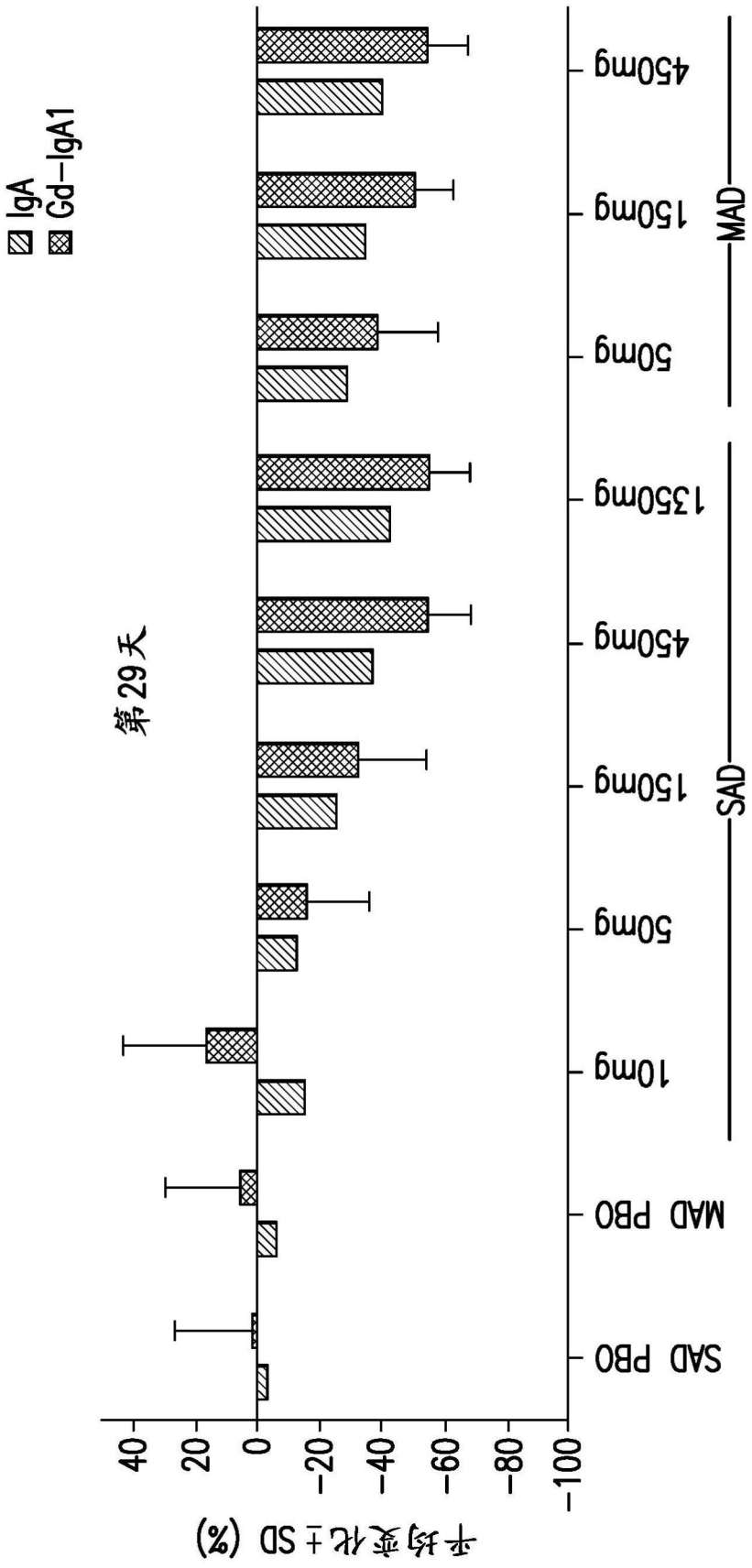

IgA
Gd-IgA1
第29天
平均变化±SD (%)
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
SAD PBO
MAD PBO
10mg
50mg
150mg
450mg
SAD
50mg
150mg
350mg
450mg
MAD

图33

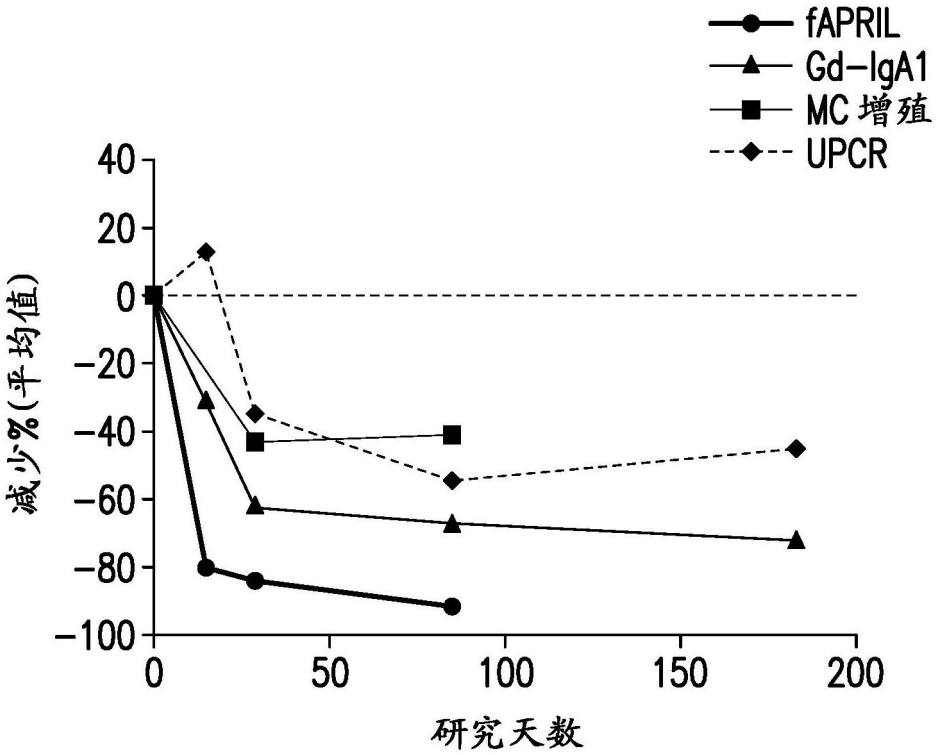

fAPRIL
Gd-IgA1
MC 增殖
UPCR
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
减少%(平均值)
0
50
100
150
200
研究天数

图34