



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101721362 B

(45)授权公告日 2018.07.03

(21)申请号 200910253760.2

(22)申请日 2003.02.14

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 101721362 A

(43)申请公布日 2010.06.09

(30)优先权数据  
2002-36244 2002.02.14 JP

(62)分案原申请数据  
03805052.8 2003.02.14

(73)专利权人 中外制药株式会社  
地址 日本东京

(72)发明人 角田正也 菊池淳 水岛秀文  
今枝好美

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038

代理人 唐晓峰

(51)Int.Cl.  
A61K 39/395(2006.01)  
A61K 9/08(2006.01)  
A61K 47/26(2006.01)  
A61K 47/36(2006.01)  
A61P 37/04(2006.01)

(56)对比文件  
US 5945098 A, 1999.08.31, 说明书第1栏第  
3段, 第3栏第6段到第4栏第5段、权利要求1-9.

审查员 卞志家

权利要求书1页 说明书20页

(54)发明名称  
包含抗体的溶液制剂

(57)摘要  
包含糖作为稳定剂的包含抗体的溶液制剂。  
所述的溶液制剂还能包含表面活性剂作为稳定  
剂。

1. 一种包含抗体的溶液制剂,包括蔗糖作为稳定剂和聚山梨醇80作为稳定剂,其中所述抗体是抗白介素-6受体抗体hPM-1,其中所述制剂中蔗糖的量是25-100mg/ml,所述制剂中聚山梨醇80的量是0.005-2mg/ml,所述制剂中抗体的量是2-22.5mg/ml,所述制剂具有5-7的pH值,并且所述制剂中的光诱导的抗体二聚作用被抑制。

2. 一种在包含抗体的溶液制剂中抑制光诱导的抗体二聚作用的方法,包括将蔗糖添加到所述溶液中,其中所述的抗体是抗白介素-6受体抗体hPM-1,其中所述制剂中蔗糖的量是25-100mg/ml,聚山梨醇80的量是0.005-2mg/ml,抗体hPM-1的量是2-22.5mg/ml,并且所述制剂具有5-7的pH值。

## 包含抗体的溶液制剂

[0001] 本申请是申请号为03805052.8的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及稳定的包含抗体的溶液制剂。

### 背景技术

[0003] 随着基因工程技术的发展,使用抗体例如免疫球蛋白、单克隆抗体和人源化抗体作为药物产品成为可能。为了以稳定的数量提供抗体药物产品,有必要确定制剂条件和储存条件,在该条件下,抗体的结构和活性能被保持。

[0004] 当蛋白质以高浓度溶液的形式储存时,它们通常会变质,例如不溶性凝集物的形成,这是必须避免的。特别地,抗体制剂有一个缺点,那就是它们会倾向于形成多聚物,从而在溶液储存期间导致不溶性凝集物。

[0005] 例如,我们发现抗-IL-6受体抗体对于不成熟骨髓瘤细胞有治疗效果(JPA HEI 8-99902),并能成功的大量生产重构人源化抗体——作为抗-IL-6受体抗体的hPM-1抗体,我们已经试图将这种纯化的抗-IL-6受体抗体制备成药物产品。人源化抗-IL-6受体抗体是一种不稳定的易受物理或化学改变的蛋白质,例如在纯化操作过程中为了除去病毒和其他微生物而在过滤、浓缩、加热和光照的压力下发生交联或凝集。

[0006] 当抗体是通过基因工程技术获得的时候,生产抗体的细胞被大量培养并纯化以产生包含抗体的溶液,然后该溶液被冷冻保存,在制剂之前被解冻。然而,由于在反复的冷冻/解冻循环期间形成了抗体二聚物或不溶性微粒,或在长期储存过程中抗体降解形成了降解产物,溶液中剩余抗体的含量会减少。

[0007] 已经做了很多努力想提供一种在溶液中储存蛋白质的方法,通过添加作为稳定剂的聚合物包括蛋白质如人血清白蛋白或纯化的明胶,或低聚物如多元醇、氨基酸和表面活性剂来防止化学或物理改变,获得了稳定的效果。然而,添加作为稳定剂的生物聚合物如蛋白质是不方便的,例如,它需要非常复杂的去除污染物如病毒和朊病毒的步骤。如果要添加低聚物,最好应当减少到最少。

[0008] 用糖或氨基糖、氨基酸和表面活性剂稳定的冻干抗体制剂也已经被报道了(JPA HEI 2001-503781)。

[0009] 然而,由于对方便使用的溶液制剂(它可能没有被溶解,使用以前被还原)有巨大需求,已经在探寻稳定的包含抗体的溶液制剂。

[0010] 发明的公开

[0011] 本发明的目的是提供包含抗体的溶液制剂,其中抗体的含量很高,通过在包含抗体的溶液制剂的制备或储存期间抑制不溶性微粒和多聚物的形成,并进一步抑制降解产物的形成,即使经过长期储存它也是稳定的。

[0012] 为了实现上述目的而进行的仔细研究的结果是,我们发现可以通过添加糖来抑制冷冻/解冻循环期间二聚物的形成或长期储存过程中多聚物和降解产物的形成,可以通过

添加表面活性剂来显著地抑制冷冻/解冻循环期间不溶性微粒的形成,并在此基础上完成了本发明。

[0013] 因此,本发明提供:

[0014] (1) 一种包含抗体的溶液制剂,其中包含糖作为稳定剂;

[0015] (2) 如(1)中定义的溶液制剂,其中还包含表面活性剂作为稳定剂;

[0016] (3) 如(1)或(2)中定义的溶液制剂,其中,糖是糖醇或非还原性寡糖;

[0017] (4) 如(1)或(2)中定义的溶液制剂,其中,糖是非还原性寡糖;

[0018] (5) 如(1)或(2)中定义的溶液制剂,其中,糖是甘露糖、蔗糖、海藻糖或棉子糖;

[0019] (6) 如(1)或(2)中定义的溶液制剂,其中,糖是蔗糖、海藻糖或棉子糖;

[0020] (7) 如(1)或(2)中定义的溶液制剂,其中,糖是蔗糖或海藻糖;

[0021] (8) 如(1)或(2)中定义的溶液制剂,其中,糖是蔗糖;

[0022] (9) 如(2)到(8)中任何一项定义的溶液制剂,其中,表面活性剂是聚山梨醇80或20;

[0023] (10) 如(1)到(9)中任何一项定义的溶液制剂,其中,抗体是重组抗体;

[0024] (11) 如(10)中定义的溶液制剂,其中,抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体;

[0025] (12) 如(1)到(11)中任何一项定义的溶液制剂,其中,抗体是IgG类抗体;

[0026] (13) 如(12)中定义的溶液制剂,其中,IgG类抗体是IgG1类抗体;

[0027] (14) 如(1)到(13)中任何一项定义的溶液制剂,其中,抗体是抗-白介素-6受体抗体或抗-HM1.24抗体;

[0028] (15) 一种在包含抗体的溶液制剂中抑制抗体多聚物分子形成的方法,包括将糖添加到溶液中;

[0029] (16) 一种在包含抗体的溶液的冷冻/解冻循环期间抑制抗体多聚物分子形成的方法,包括将非还原性寡糖添加到溶液中;

[0030] (17) 一种在包含抗体的溶液的冷冻/解冻循环期间抑制抗体多聚物分子形成的方法,包括将非还原性二糖或非还原性三糖添加到溶液中;

[0031] (18) 一种在包含抗体的溶液的冷冻/解冻循环期间抑制不溶性微粒形成的方法,包括加入表面活性剂;

[0032] (19) 一种在包含抗体的溶液的冷冻/解冻循环期间稳定抗体的方法,包括加入非还原性糖和表面活性剂。

[0033] 本发明最优的实例

[0034] 此处所用的“包含抗体的溶液制剂”指的是包含抗体作为活性成分的溶液制剂,用于对动物如人给药,优选在制备过程中不包含冻干步骤的溶液制剂。

[0035] 此处所用的“包含抗体的溶液”可以是包含任何抗体(无论是生物衍生的或是重组的)的溶液,优选培养基,其中,包含抗体的哺乳动物细胞如CHO细胞已经过培养,或是将这种培养基经过例如局部纯化(本体溶液)处理而获得的溶液,或是用于对动物如人给药的如上定义的溶液制剂。

[0036] 此处所用的术语“不溶性微粒”指的是如日本药局方中“一般试验、方法和仪器”部分中的“注射液中不溶性微粒物质试验”章中所定义的10 $\mu$ m或更大的不溶性的颗粒物质。不溶性微粒可以用显微镜、不溶性微粒收集滤器、分析膜滤器或方便地使用自动光阻塞颗粒

计数器来测量。

[0037] 此处所用的“不溶性物质”指的是容易发觉的不溶性的物质,如日本药局方中“一般试验、方法和仪器”部分中的“注射液的异质不溶性物质试验”章中所定义的,当在白炽灯光强度大约1000勒克斯下用裸眼检查容器时,注射液必须澄明、不含不溶物。

[0038] 此处所用的“多聚物”和“降解产物”分别指的是构成制剂活性成分的抗体分子的多聚物和降解产物,它们的含量可以用随后描述的基于凝胶渗透色谱的峰面积百分数法(peak area percentage method)来测量。

[0039] 用在本发明溶液制剂中的抗体不受特殊限制,只要它们能和特定抗原结合,小鼠抗体、大鼠抗体、兔抗体、羊抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体等都是合适的抗体。抗体可以是多克隆的或单克隆的,但优选单克隆的,因为能稳定地生产均一的抗体。多克隆抗体和单克隆抗体可以用本领域技术人员熟知的方法来制备。

[0040] 生产单克隆抗体的杂交瘤可以用下列已知技术基本地构造。特定抗原或表达特定抗原的细胞被用作免疫原来免疫宿主细胞(根据标准免疫技术),产生的免疫细胞和已知母细胞融合(用标准细胞融合技术),然后用标准筛选法筛选融合细胞来寻找生产单克隆抗体的细胞(杂交瘤)。可以用例如Milstein等人的方法(Kohler.G.和Milstein,C.,Methods Enzymol. (1981) 73:3-46)来进行杂交瘤的构建。如果抗原具有低的免疫原性,它可以和免疫原性大分子如白蛋白结合,用于免疫接种。

[0041] 也可以使用重组抗体,它是用基因工程技术,通过用包含了克隆自杂交瘤的抗体基因的合适载体转染宿主生产的(参见例如Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, MACMILLAN PUBLISHERS LTD在英国出版,1990)。特别地,抗体可变区(V区)的cDNA序列是用逆转录酶合成自杂交瘤的mRNA的。一旦获得编码感兴趣抗体V区的DNA序列,它们就被连接到编码感兴趣抗体恒定区(C区)的DNA序列上,并被整合进表达载体。择一地,编码抗体V区的DNA序列可以被整合到包含抗体C区DNA序列的表达载体中。通过在调节区如增强子和启动子的控制下表达的方式将它们整合到表达载体中。然后用这种表达载体转染宿主细胞以表达抗体。

[0042] 在本发明中,可以使用重组抗体,也就是人工修饰以减少对人的抗原性或实现其它目的的抗体,例如嵌合抗体和人源化抗体。这些经修饰的抗体可以用已知方法制备。嵌合抗体由来自非人动物如小鼠的抗体的重链和轻链可变区和人抗体的重链和轻链恒定区组成,可以通过将编码小鼠抗体可变区的DNA序列连接到人抗体恒定区的DNA序列上、并用包含连接序列的表达载体转染宿主使其产生嵌合抗体来获得。

[0043] 人源化抗体也称为重构人抗体,通过将来自非人动物如小鼠的抗体的互补决定区(CDRs)移植到人抗体的互补决定区上而获得,制备它们的典型的基因重组技术是已知的。特别地,企图将小鼠抗体的CDRs连接到人抗体的框架区(FRs)的DNA序列可以用数种制备好的具有末端重叠区的寡核苷酸通过PCR来合成。得到的DNA序列被连接到编码人抗体恒定区的DNA序列上,然后被整合到表达载体种,其被转染给宿主以生产重构抗体(参见欧洲专利公开号EP 239400,国际公开号WO 96/02576)。与CDRs相连的人抗体的FRs是用互补决定区形成适当的抗原结合部位的方法进行选择的。如果需要的话,重构人源化抗体可以在可变区的框架区有一些氨基酸的改变,以使互补决定区形成适当的抗原结合部位(Sato, K. 等人, Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

[0044] 获得人抗体的方法也是已知的。例如,和特定抗原具有结合活性的特定的人抗体可以用特定抗原或用表达特定抗原的细胞体外免疫人淋巴细胞并将免疫淋巴细胞与人骨髓瘤细胞如U266相融合来获得(参见JPB No.HEI 1-59878)。特定人抗体也可以用抗原免疫具有所有人抗体基因库的转基因动物来获得(参见国际公开号W0 93/12227、W092/03918、W0 94/02602、W0 94/25585、W0 96/34096、W0 96/33735)。使用人抗体基因库通过淘选获得人抗体的方法也是已知的。例如,用噬菌体表面展示技术在噬菌体表面将人抗体的可变区表达成单链抗体片断(scFv)来选择与抗原结合的噬菌体。编码与抗原结合的人抗体可变区的DNA序列可以通过分析所选噬菌体的基因来确定。完整的人抗体可以在确定了与抗原结合的scFv片断的DNA序列的基础上,通过制备适当的表达载体来获得。这些方法相对于W0 92/01047、W0 92/20791、W0 93/06213、W0 93/11236、W0 93/19172、W0 95/01438、W0 95/15388都是已知的。

[0045] 当一个抗体是通过将预先分离的抗体基因转染到适当的宿主中来制备时,适当的宿主可以和表达载体联合使用。用作宿主的合适的真核细胞包括动物细胞、植物细胞和真菌细胞。已知的动物细胞包括(1)哺乳动物细胞如CHO、COS、骨髓瘤、BHK(小仓鼠肾)、HeLa和Vero细胞;(2)两栖动物细胞如非洲蟾蜍卵母细胞;或(3)昆虫细胞如sf9、sf21和Tn5。已知的植物细胞包括烟草如*Nicotiana tabacum*的细胞,它可以用于骨痂培养。已知的真菌细胞包括酵母如*Saccharomyces spp.*,如*Saccharomyces cerevisiae*和丝状真菌如*Aspergillus spp.*,如*Aspergillus niger*。原核细胞可以被用作使用细菌细胞的生产系统。已知的细菌细胞包括*E.Coli*和*Bacillus subtilis*。可以用感兴趣的抗体基因转染这些细胞并在体外培养转染细胞来获得抗体。

[0046] 本发明的稳定化制剂中包含的抗体包括,但并不限于,抗-IL-6受体抗体、抗-HM1.24抗原单克隆抗体、抗甲状旁腺激素相关肽抗体(抗-PTHrP抗体)等等。

[0047] 用于本发明的优选的重构人源化抗体包括人源化抗-IL-6受体抗体(hPM-1)(参见国际公开号W0 92-19759)、人源化抗-HM1.24抗原单克隆抗体(参见国际公开号W0 98-14580)和人源化抗甲状旁腺激素相关肽抗体(抗-PTHrP抗体)(参见国际公开号W0 98-13388)。

[0048] 包含在本发明溶液制剂中的抗体可能属于任何免疫球蛋白类,优选IgG如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,更优选IgG1。

[0049] 本发明的包含抗体的溶液制剂优选地多聚物没有增加,经过冷冻/解冻循环以后,每毫升包含50个或小于50个不溶性微粒。

[0050] 在本发明的包含抗体的溶液或溶液制剂中,在冷冻/解冻循环期间二聚物的形成可以通过添加糖来抑制。可以使用的糖包括非还原性寡糖,如非还原性二糖如蔗糖和海藻糖,或非还原性三糖如棉子糖,尤其优选的是非还原性寡糖。优选的非还原性寡糖是非还原性二糖,更优选蔗糖和海藻糖。

[0051] 在本发明的包含抗体的溶液或溶液制剂中,在长期储存过程中多聚物和降解产物的形成可以通过添加糖来抑制。可以使用的糖包括糖醇如甘露醇和山梨糖醇、非还原性寡糖如非还原性二糖如蔗糖和海藻糖或非还原性三糖如棉子糖,其中非还原性寡糖尤其优选。优选的非还原性寡糖是非还原性二糖,更优选蔗糖和海藻糖。

[0052] 糖应当以0.1-500mg/mL、优选10-300mg/mL、更优选25-100mg/mL的浓度添加。

[0053] 在本发明中,包含抗体的溶液制剂在冷冻/解冻循环期间不溶性微粒的形成可以通过加入表面活性剂显著地抑制。表面活性剂的典型例子包括:

[0054] 非离子表面活性剂,如脱水山梨糖醇脂肪酸酯,如脱水山梨糖醇单辛酸酯、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、脱水山梨糖醇单棕榈酸酯;甘油脂肪酸酯,如甘油单辛酸酯、甘油单肉豆蔻酸酯、甘油单硬脂酸酯;聚甘油脂肪酸酯,如十甘油单硬脂酸酯、十甘油二硬脂酸酯、十甘油单亚油酸酯;聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯,如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单棕榈酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇三油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇三硬脂酸酯;聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯,如聚氧乙烯山梨糖醇四硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇四油酸酯;聚氧乙烯甘油脂肪酸酯,如聚氧乙烯甘油单硬脂酸酯;聚氧乙烯乙二醇脂肪酸酯,如聚氧乙烯乙二醇二硬脂酸酯;聚氧乙烯烷基醚,如聚氧乙烯月桂基醚;聚氧乙烯聚氧丙稀烷基醚,如聚氧乙烯聚氧丙稀乙二醇醚、聚氧乙烯聚氧丙稀丙基醚、聚氧乙烯聚氧丙稀鲸蜡基醚;聚氧乙烯烷基苯基醚,如聚氧乙烯壬基苯基醚;聚氧乙烯氢化蓖麻油,如聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯氢化蓖麻油(聚氧乙烯氢化蓖麻油);聚氧乙烯蜂蜡衍生物,如聚氧乙烯山梨糖醇蜂蜡;聚氧乙烯羊毛脂衍生物,如聚氧乙烯羊毛脂;聚氧乙烯脂肪酸酰胺,如HLB 6-18的聚氧乙烯硬脂酸酰胺。

[0055] 阴离子表面活性剂,如具有C10-18烷基的烷基硫酸盐如十六烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钠、油基硫酸钠;具有平均EO摩尔数2-4和C10-18烷基的聚氧乙烯烷基醚硫酸盐,如聚氧乙烯月桂基硫酸钠;具有C8-18烷基的烷基硫代琥珀酸酯盐,如月桂基硫代琥珀酸钠;以及

[0056] 天然表面活性剂,如卵磷脂;甘油磷脂;神经鞘氨醇磷脂,如神经鞘磷脂;C12-18脂肪酸的蔗糖脂肪酸酯。本发明的制剂可以同时包含一种或多种这样的表面活性剂。优选用在本发明溶液制剂中的表面活性剂是聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯,如聚山梨醇20、40、60或80,优选聚山梨醇20和80。聚氧乙烯聚氧丙稀乙二醇,如泊洛沙姆(如Pluronic®F-68)也是优选的。

[0057] 所添加的表面活性剂的量随着所用的特定表面活性剂的类型而改变,在聚山梨醇20或聚山梨醇80的情况下,代表性地是0.001-100mg/mL,优选0.003-50mg/mL,更优选0.005-2mg/mL。

[0058] 优选地,本发明包含抗体的溶液制剂基本上不包含蛋白质作为稳定剂,如人血清白蛋白或纯化的明胶。

[0059] 本发明抗体制剂优选pH 4-8,更优选5-7,最优选6-6.5。然而pH取决于所包含的抗体,并不限于这些值。

[0060] 本发明制剂可能还包含等张剂,如聚乙二醇;和糖,如葡聚糖、甘露醇、山梨糖醇、肌醇、葡萄糖、果糖、乳糖、木糖、甘露糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖和棉子糖。

[0061] 如果需要的话,本发明包含抗体的溶液制剂还可以包含稀释剂、增溶剂、赋形剂、pH调节剂、镇定剂、缓冲剂、含硫的还原剂和抗氧化剂等。例如,含硫的还原剂包括N-乙酰半胱氨酸、N-乙酰高半胱氨酸、硫辛酸、硫代二甘醇、硫代乙醇胺、硫代甘油、硫代山梨糖醇、硫代乙醇酸及其盐、硫代硫酸钠、谷胱甘肽,以及含巯基的化合物,如具有1-7个碳原子的硫代烷醇酸。抗氧化剂包括异抗坏血酸、二丁羟甲苯、丁基羟基苯甲醚、 $\alpha$ -生育酚、生育酚乙酸

酯、L-抗坏血酸及其盐、L-抗坏血酸棕榈酸盐、L-抗坏血酸硬脂酸盐、二亚硫酸钠、亚硫酸钠、没食子酸三戊酯、没食子酸丙基酯,或螯合剂,如乙二胺四乙醇酸二钠(EDTA)、焦磷酸钠和偏磷酸钠。也可以包含其它通常的添加剂,如无机盐如氯化钠、氯化钾、氯化钙、磷酸钠、磷酸钾和重碳酸钠,和有机盐如柠檬酸钠、柠檬酸钾和乙酸钠。

[0062] 本发明的制剂可以通过将这些组分溶解于溶液制剂领域已知的水性缓冲液,如磷酸盐缓冲液(优选磷酸一氢钠-磷酸二氢钠体系)和/或柠檬酸盐缓冲液(优选柠檬酸钠缓冲液)和/或醋酸盐缓冲液中来制备溶液制剂。缓冲液的浓度典型地是1-500mM,优选5-100mM,更优选10-20mM。

[0063] 本发明包含抗体的溶液制剂通常是通过胃肠外途径给药,例如注射(如皮下、静脉内、肌肉或腹膜内注射)或经皮、粘膜、鼻腔或肺部给药,但也可以口服给药。

[0064] 本发明包含抗体的溶液制剂通常装在固定的密封灭菌的塑料或玻璃容器内,如小瓶、安瓿或注射器或大体积的容器如瓶子中。习惯优选预先充满的瓶子。

[0065] 包含在本发明制剂中的抗体的量典型地是0.1-200mg/mL,优选1-120mg/mL,更优选2-22.5mg/mL,这取决于所要治疗的疾病的类型,疾病的严重程度,患者的年龄和其它因素。

[0066] 在本发明的溶液制剂中,不溶性微粒的形成尤其是在冷冻/解冻循环期间的形成可以通过添加表面活性剂被显著地抑制,在长期储存期间不溶性物质的形成也能通过添加表面活性剂被显著地抑制,如下列实施例中所示。还发现通过添加糖,多聚物例如二聚物的形成以及降解产物的形成能被显著地抑制,同时剩余抗体单体的含量能增加。

[0067] 下列实施例进一步解释了本发明,但并不限制本发明的范围。基于本发明的描述,本领域技术人员可以进行各种改变和变型,这些改变和变型也包括在本发明的范围之内。

## 实施例

### [0068] 抗体样品

[0069] hPM-1抗体被用作人源化抗-IL-6受体抗体。hPM-1抗体是人源化hPM-1抗体,它是按照JPA HEI 8-99902的对比实施例2中描述的方法、用国际专利公开号W0 92/19759的实施例10中描述的人延伸因子I $\alpha$ 启动子来制备的。

[0070] 按照国际专利公开号W098-35698的对比实施例2中描述的方法制备的抗体(以下称为抗-HM1.24抗体)被用作人源化抗-HM1.24抗原单克隆抗体。

[0071] 用在下列实施例中的hPM-1抗体和抗-HM1.24抗体都是IgG1类抗体。

### [0072] 试验方法

[0073] (A) 有关hPM-1抗体的试验

[0074] (1) 凝胶渗透色谱(GPC)

[0075] 每一样品都用流动相稀释至hPM-1的含量大约是每1mL含1mg,取30-60 $\mu$ L在下列HPLC条件下进行试验。

[0076] 柱:TSK凝胶G3000 SW<sub>XL</sub>(TOSOH)

[0077] 预柱:TSK预柱SW<sub>XL</sub>(TOSOH)

[0078] 柱温:恒定在大约25 $^{\circ}$ C

[0079] 流动相:50mM磷酸盐缓冲液(pH 7.0)-300mM氯化钠

[0080] 流速:大约1.0mL/分钟

[0081] 检测波长:280nm。

[0082] 用自动积分仪测量峰面积,从标准hPM-1产品的峰面积计算hPM-1的含量,使用下列方程式从最初计算结果来计算剩余hPM-1的百分数:

[0083]  $\text{hPM-1含量 (mg/mL)} = (\text{标准hPM-1产品的浓度} \times \text{试验样品的峰面积}) \div \text{标准hPM-1产品的峰面积}$

[0084]  $\text{剩余hPM-1的百分数 (\%)} = (\text{热加速和冷冻/解冻循环以后hPM-1的含量} \div \text{最初的hPM-1含量}) \times 100。$

[0085] 使用下列方程式通过面积百分数法计算二聚物、其它多聚物和降解产物的百分数:

[0086]  $\text{二聚物(或其它多聚物或降解产物) (\%)} = [\text{二聚物(或其它多聚物或降解产物)的峰面积} \div \text{总的峰面积}] \times 100$

[0087] (2) 用光阻塞自动颗粒计数器(HIAC)估计不溶性微粒的数量

[0088] 根据日本药局方中“一般试验、方法和仪器”部分中的“注射液中不溶性微粒物质试验”章中描述的自动光阻塞颗粒计数器的方法来进行估计。

[0089] (3) 自动视觉检查(automated visual inspection)

[0090] 根据日本药局方中“一般试验、方法和仪器”部分中的“注射液中异质不溶性物质试验”章中描述的方法进行自动视觉检查。

[0091] 视觉检查系统:E422型(Eisai)。

[0092] (B) 有关抗-HM1.24抗体的试验

[0093] (1) 凝胶渗透色谱(GPC);以N=3来测量以评价相对于最初含量的剩余百分数(%),并评价多聚物和降解产物的百分数。

[0094] 柱:TSK凝胶G3000 SW<sub>XL</sub>(TOSOH)

[0095] 预柱:TSK预柱SW<sub>XL</sub>(TOSOH)

[0096] 柱温:恒定在大约25℃

[0097] 流动相:50mM磷酸盐缓冲液(pH 7.0)-300mM氯化钠

[0098] 流速:大约0.5mL/分钟

[0099] 检测波长:280nm。

[0100] 计算浓度的方法

[0101]  $\text{抗-HM1.24抗体含量 (mg/mL)} = (\text{标准浓度} \times \text{抗-HM1.24抗体峰面积} \times \text{所用的标准的量}) \div (\text{总的标准峰面积} \times \text{所用试验样品的量})$

[0102]  $\text{剩余抗-HM1.24抗体的百分数 (\%)} = (\text{热加速以后抗-HM1.24抗体的含量} \div \text{最初抗-HM1.24抗体的含量}) \times 100$

[0103] 用面积百分数法计算多聚物和降解产物的百分数。

[0104]  $\text{多聚物(或降解产物) (\%)} = (\text{多聚物(或降解产物)的峰面积} \div \text{总的峰面积}) \times 100$

[0105] 实施例1:添加表面活性剂的影响(1)

[0106] 测试表面活性剂(聚山梨醇80)对热稳定性和冷冻/解冻稳定性的影响。制备表1中所示的包含各种浓度聚山梨醇80的样品并进行如下试验。

[0107] (1) 用凝胶渗透色谱(GPC)测得的剩余hPM-1百分数和多聚物和降解产物的形成来

评价对热加速 (50 °C-2W) 的稳定性。用自动光阻塞颗粒计数器 (HIAC) 测量每毫升不溶性微粒的数量。

[0108] (2) 用凝胶渗透色谱 (GPC) 测得的剩余 hPM-1 百分数和多聚物和降解产物的形成来评价对冷冻/解冻循环 (在 -20 °C 保存三天, 然后 5 °C 保存一天, 重复 3 个循环) 的稳定性。用自动光阻塞颗粒计数器 (HIAC) 测量每毫升不溶性微粒的数量。

[0109] 得到的结果示于表 1 中。

[0110] 表 1

( 试验样品和结果 )		样品 1	样品 2	样品 3	样品 4
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0	0.25	0.5	0.75
磷酸钠 (mM)		15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5
开始	hPM-1 含量 (mg/mL)	20.1	20.3	20.3	20.4
	二聚物 (%)	0.21	0.22	0.22	0.23
	其它多聚物 (%)	0	0	0	0
	降解产物 (%)	0	0	0	0
	10 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	2	0
	25 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0	0
热加速 (50 °C - 2W)	剩余 hPM-1 (%)	99.4	98.2	98.1	98.0
	二聚物 (%)	1.38	1.39	1.39	1.41
	其它多聚物 (%)	0	0	0	0
	降解产物 (%)	0.91	0.91	0.90	0.90
	10 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0	0
	25 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0	0
冷冻 / 解冻 (-20 °C → 5 °C, 3 个循 环)	剩余 hPM-1 (%)	99.7	99.6	99.4	99.3
	二聚物 (%)	0.60	0.56	0.52	0.49
	其它多聚物 (%)	0	0	0	0
	降解产物 (%)	0	0	0	0
	10 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	3287	7	1	4
	25 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	539	3	0	0

[0112] 已发现, 在冷冻/解冻循环期间通过添加聚山梨醇 80 能显著地抑制不溶性微粒的形成。随着聚山梨醇 80 浓度的改变, 稳定性没有显著的变化。

[0113] 实施例 2: 添加表面活性剂的影响 (2)

[0114] 测试表面活性剂 (聚山梨醇 80) 对冷冻/解冻循环和振动的稳定性的影响。制备表 2 中所示的包含各种浓度聚山梨醇 80 的样品并进行如下试验。

[0115] 用自动光阻塞颗粒计数器 (HIAC) 测得的每毫升不溶性微粒的数量来评价对冷冻/

解冻循环(在-20℃储存8小时,然后5℃8小时,2个循环)的稳定性。不溶性物质的存在与否用自动视觉检查来评价。

[0116] 得到的结果示于表2中。

[0117] 表2

[0118] (试验样品和结果)

		样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20	20	20
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0	0.005	0.05	0.25	0.5	0.75
蔗糖 (mg/mL)		50	50	50	50	50	50
磷酸钠 (mM)		15	15	15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
[0119] 开始	10 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	10	0	0	0	0	0
	25 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	2	0	0	0	0	0
	不溶性物质	有	无	无	无	无	无
冷冻 / 解冻循环 (-20℃ → 5℃, 2个周期)	10 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	7020	8	0	0	0	1
	25 μm 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	601	0	0	0	0	0
	不溶性物质	有	有	无	无	无	无

[0120] 已发现,在冷冻/解冻循环期间通过添加聚山梨醇80能显著地抑制不溶性微粒和不溶性物质的形成。对不溶性物质形成的影响取决于聚山梨醇80的浓度。

[0121] 实施例3:添加糖的影响

[0122] 测试添加糖对冷冻/解冻循环的影响。制备表3中所示的包含各种糖(蔗糖、甘露糖、海藻糖)的样品并用从凝胶渗透色谱(GPC)测得的所形成的二聚体的量来评价对冷冻/解冻循环(在-20℃储存2小时,然后5℃储存2小时,重复22个循环)的稳定性。

[0123] 表3

[0124] (试验样品和结果)

		样品 11	样品 12	样品 13	样品 14	样品 15
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20	20
蔗糖 (mg/mL)		0	50	0	0	0
甘露糖 (mg/mL)		0	0	50	94	0
海藻糖 (mg. mL)		0	0	0	0	50
[0125]	聚山梨醇 80 (mg/mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
磷酸钠 (mM)		15	15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
开始	二聚体 (%)	0.42	0.43	0.41	0.38	0.42
冷冻 / 解冻 (-20°C → 5°C, 22 个循环)	二聚体 (%)	0.67	0.43	0.89	2.60	0.41

[0126] 已发现,可以通过添加蔗糖和海藻糖抑制二聚体的形成。

[0127] 实施例4:蔗糖对热稳定性和冷冻/解冻稳定性的影响

[0128] 测试蔗糖对热稳定性和冷冻/解冻稳定性的影响。制备表4中所示的包含各种浓度蔗糖的样品并进行如下试验。

[0129] (1)用凝胶渗透色谱(GPC)测得的剩余hPM-1百分数和多聚物和降解产物的形成来评价对热加速(50°C-2W)的稳定性。用自动光阻塞颗粒计数器(HIAC)测量每毫升不溶性微粒的数量。

[0130] (2)用凝胶渗透色谱(GPC)测得的剩余hPM-1百分数和多聚物和降解产物的形成来评价对冷冻/解冻循环(在-20°C保存三天,然后5°C保存一天,重复3个循环)的稳定性。用自动光阻塞颗粒计数器(HIAC)测量每毫升不溶性微粒的数量。

[0131] 得到的结果示于表4中。

[0132] 表4

[0133] (试验样品和结果)

		样品 16	样品 17	样品 18	样品 19
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
蔗糖 (mg/mL)		0	25	50	100
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5	0.5
磷酸钠 (mM)		15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5
开始	hPM-1 含量 (mg/mL)	19.2	19.2	19.3	19.3
	二聚物 (%)	0.18	0.16	0.15	0.15
	其它多聚物 (%)	0	0	0	0
	降解产物 (%)	0	0	0	0
	10 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	12	0
	25 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	1	0
[0134] 热加速 (50 $^{\circ}\text{C}$ - 2W)	剩余 hPM-1 (%)	98.2	98.5	97.8	97.8
	二聚物 (%)	1.37	1.47	1.36	1.41
	其它多聚物 (%)	0	0	0	0
	降解产物 (%)	0.92	0.89	0.89	0.89
	10 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0	0
	25 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0	0
冷冻 / 解冻 (-20 $^{\circ}\text{C}$ $\rightarrow$ 5 $^{\circ}\text{C}$ , 3 个循环)	剩余 hPM-1 (%)	100.2	100.8	100.4	100.2
	二聚物 (%)	0.36	0.18	0.17	0.15
	其它多聚物 (%)	0	0	0	0
	降解产物 (%)	0	0	0	0
	10 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	1	3	5	2
	25 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	1	0	0	0

[0135] 已发现,通过添加蔗糖可以显著地抑制冷冻/解冻循环期间二聚物的形成。随着蔗糖浓度的改变,稳定性没有显著的变化。

[0136] 实施例5:抗体浓度的影响

[0137] 测试hPM-1浓度对热稳定性的影响。制备表5中所示的包含各种浓度hPM-1的样品并进行下列试验。

[0138] 用凝胶渗透色谱(GPC)测得的剩余hPM-1百分数和多聚物和降解产物的形成来评价对热加速(50  $^{\circ}\text{C}$ -2W)的稳定性。用自动光阻塞颗粒计数器(HIAC)测量每毫升不溶性微粒的数量。

[0139] 测得的结果示于表5中。

[0140] 表5

[0141] (试验样品和结果)

		样品 20	样品 21	样品 22
hPM-1 (mg/mL)		17.5	20	22.5
蔗糖 (mg/mL)		50	50	50
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5
磷酸钠 (mM)		15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5
[0142] 开始	hPM-1 含量 (mg/mL)	17.0	19.3	21.4
	二聚物 (%)	0.16	0.16	0.18
	其它多聚物 (%)	0	0	0
	降解产物 (%)	0	0	0
	10 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0
	25 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0
热加速 (50 $^{\circ}\text{C}$ - 2W)	剩余 hPM-1 (%)	99.6	100.2	99.8
	二聚物 (%)	1.26	1.35	1.45
	其它多聚物 (%)	0	0	0
	降解产物 (%)	0.95	0.93	0.99
	10 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	3	0
	25 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0

[0143] 发现hPM-1浓度对稳定性没有改变。

[0144] 实施例6:磷酸盐缓冲液浓度的影响

[0145] 测试磷酸盐缓冲液的浓度对热稳定性的影响。制备表6中所示的包含各种浓度磷酸盐缓冲液的样品并进行如下试验。

[0146] 用凝胶渗透色谱(GPC)测得的剩余hPM-1百分数和多聚物和降解产物的形成来评价对热加速(50 $^{\circ}\text{C}$ -2W)的稳定性。用自动光阻塞颗粒计数器(HIAC)测量每毫升不溶性微粒的数量。

[0147] 测得的结果示于表6中。

[0148] 表6

[0149] (试验样品和结果)

		样品 23	样品 24	样品 25
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20
蔗糖 (mg/mL)		50	50	50
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5
磷酸钠 (mM)		10	15	20
pH		6.5	6.5	6.5
[0150] 开始	hPM-1 含量 (mg/mL)	19.3	19.4	19.4
	二聚物 (%)	0.17	0.18	0.18
	其它多聚物 (%)	0	0	0
	降解产物 (%)	0	0	0
	10 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0
	25 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0
热加速 (50 °C - 2W)	剩余 hPM-1 (%)	100.1	99.0	99.2
	二聚物 (%)	1.37	1.43	1.45
	其它多聚物 (%)	0	0	0
	降解产物 (%)	0.94	0.95	0.94
	10 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0
	25 $\mu\text{m}$ 或更大的微粒的数量 (微粒数/mL)	0	0	0

[0151] 发现磷酸盐浓度对稳定性没有改变。

[0152] 实施例7: 添加糖的影响

[0153] 进行热稳定性试验以评价当抗-HM1.24抗体的浓度为2.5-10mg/mL时添加糖(蔗糖或甘露醇)的影响。在各种储存条件下(60°C-1W、50°C-3M、5°C-6M, 开始)测量小容量和大容量抗-HM1.24抗体制剂(1mL/5mL安瓿)中包含各种浓度的糖的样品的剩余百分数(%)、多聚物(%)和降解产物(%)。

[0154] 测试低浓度制剂, 结果示于表7和8中, 同时测试高浓度制剂, 结果示于表9和10中。

[0155] 表7

[0156]

	样品 26	样品 27	样品 28	样品 29	样品 30	样品 31	样品 32
抗-H.M1.24抗体 (mg/mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
蔗糖 (mg/mL)	10	50	100	-	-	-	-
甘露醇 (mg/mL)	-	-	-	10	50	100	-
氯化钠 (mM)	100	100	100	100	100	100	100
pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

[0157] 表8

[0158]

60°C-1W	剩余百分数 (%)	多聚物 (%)	降解产物 (%)
样品26	90.9%	5.06%	1.99%
样品27	91.1%	4.60%	1.98%

样品28	90.0%	4.14%	2.05%
样品29	85.5%	5.04%	2.20%
样品30	90.3%	4.99%	1.99%
样品31	86.6%	5.57%	2.63%
样品32	88.9%	5.39%	2.09%

[0159]

50℃-3M	剩余百分数(%)	多聚物(%)	降解产物(%)
样品26	77.0%	14.0%	6.98%
样品27	81.5%	13.7%	6.46%
样品28	84.9%	12.9%	4.83%
样品29	78.9%	14.3%	7.31%
样品30	75.2%	13.2%	6.72%
样品31	76.1%	12.7%	6.24%
样品32	76.8%	15.5%	7.62%

[0160]

5℃-6M	剩余百分数(%)	多聚物(%)	降解产物(%)
样品26	103.8%	3.82%	0.00%
样品27	104.0%	3.44%	0.00%
样品28	104.2%	3.43%	0.00%
样品29	103.8%	3.49%	0.00%
样品30	104.3%	3.46%	0.00%
样品31	104.3%	3.45%	0.00%
样品32	103.5%	3.49%	0.00%

[0161]

开始	剩余百分数(%)	多聚物(%)	降解产物(%)
样品26	100.0%	3.73%	0.00%
样品27	100.0%	3.34%	0.00%
样品28	100.0%	3.34%	0.00%
样品29	100.0%	3.38%	0.00%
样品30	100.0%	3.36%	0.00%
样品31	100.0%	3.36%	0.00%
样品32	100.0%	3.38%	0.00%

[0162] 50℃-3M热加速以后,样品显示剩余抗体单体百分数增加,多聚物和降解产物的形成减少,这取决于所加蔗糖的浓度。60℃-1W加速以后,样品也显示形成的多聚物的量减少。在50℃-3M热加速条件下,糖添加剂对剩余抗体百分数的影响是蔗糖比甘露醇更显著。还发现了甘露醇这种糖添加剂对抑制交联的影响。

[0163] 表9

[0164]

	样品33	样品34	样品35	样品36	样品37	样品38
抗-H.M1.24抗体(mg/mL)	2.5	5.0	5.0	10	10	10

聚山梨醇80(%)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
醋酸盐(mM)	20	20	20	20	20	20
NaCl(mM)	100	100	100	100	100	100
pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
蔗糖(mg/mL)	10	10	20	10	40	0

[0165] 表10

[0166]

60℃-1W	剩余百分数(%)	多聚物(%)	降解产物(%)
样品33	96.6%	4.78%	2.16%
样品34	96.1%	6.47%	1.84%
样品35	96.1%	6.33%	1.84%
样品36	96.1%	6.66%	1.76%
样品37	97.0%	5.96%	1.75%
样品38	95.3%	7.11%	1.82%

[0167]

50℃-1M	剩余百分数(%)	多聚物(%)	降解产物(%)
样品33	94.6%	5.01%	2.12%
样品34	95.9%	5.62%	2.06%
样品35	95.9%	5.27%	2.09%
样品36	96.7%	5.37%	1.97%
样品37	97.1%	4.95%	1.96%
样品38	95.5%	5.69%	2.02%

[0168]

5℃-6M	剩余百分数(%)	多聚物(%)	降解产物(%)
样品33	107.8%	3.50%	0.00%
样品34	106.1%	3.52%	0.00%
样品35	106.1%	3.51%	0.00%
样品36	104.0%	3.59%	0.00%
样品37	104.1%	3.57%	0.00%
样品38	103.7%	3.61%	0.00%

[0169]

开始	剩余百分数(%)	多聚物(%)	降解产物(%)
样品33	100.0%	3.40%	0.00%
样品34	100.0%	3.36%	0.00%
样品35	100.0%	3.36%	0.00%
样品36	100.0%	3.38%	0.00%
样品37	100.0%	3.37%	0.00%
样品38	100.0%	3.39%	0.00%

[0170] 比较热加速后形成的多聚物的量显示,当抗-HM1.24抗体的浓度相同时,所添加的蔗糖的浓度增大,交联被抑制得越显著。还发现蔗糖对高浓度的抗-HM1.24抗体制剂的交联

也有抑制作用。

[0171] 实施例8:糖添加剂的影响

[0172] 进一步测试各种含量的蔗糖添加剂的影响。制备表11中所示的样品并在50℃-1M下储存,之后用GPC测量剩余单体抗体的百分数和多聚物的量。测得的结果示于表12中。

[0173] 表11

[0174]

	样品39	样品40	样品41	样品42
抗-H.M1.24抗体 (mg/mL)	10	10	10	10
聚山梨醇80 (%)	0.05	0.05	0.05	0.05
醋酸盐 (mmol/L)	10	10	10	10
NaCl (mmol/L)	100	100	100	100
pH	6.0	6.0	6.0	6.0
蔗糖 (mg/mL)	0	25	50	75

[0175] 表12

	剩余百分数 (%)		多聚物 (%)	
	开始	50℃ - 1M	开始	50℃ - 1M
[0176] 样品 39	100.0%	83.3%	3.6%	12.2%
样品 40	100.0%	86.4%	3.6%	9.7%
样品 41	100.0%	87.8%	3.5%	8.4%
样品 42	100.0%	87.2%	3.5%	8.9%

[0177] 已发现,蔗糖对于抑制抗-HM1.24抗体多聚物的形成是有效的。

[0178] 实施例9:添加糖的影响(冷冻/解冻试验)

[0179] 测试添加糖(非还原性二糖和非还原性三糖)对冷冻/解冻稳定性的影响。制备表13中所示的含糖样品,并在下列条件下进行冷冻/解冻试验。

[0180] 用凝胶渗透色谱(GPC)测得的二聚物(多聚物)的形成来评价对冷冻/解冻循环的稳定性。

[0181] (试验条件)

[0182] 解冻:-20℃→5℃(1小时) 保持:5℃(6小时)

[0183] 冷冻:5℃→-20℃(1小时) :-20℃(16小时)

[0184] 上述温度循环重复3、7和21次。

[0185] 表13

[0186] (试验样品和结果)

		样品 43	样品 44	样品 45	样品 46
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5	0.5
磷酸钠 (mM)		15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5
添加剂 (mM)		-	蔗糖 145	海藻糖 145	棉子糖 145
[0187] 开始	二聚物 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
	其它多聚物 (%)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	多聚物总量 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
3 个冷冻/解冻循环	二聚物 (%)	0.7	0.4	0.5	0.8
	其它多聚物 (%)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	多聚物总量 (%)	0.7	0.4	0.5	0.8
7 个冷冻/解冻循环	二聚物 (%)	0.8	0.5	0.4	1.0
	其它多聚物 (%)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	多聚物总量 (%)	0.8	0.5	0.4	1.0
21 个冷冻/解冻循环	二聚物 (%)	1.0	0.4	0.5	1.3
	其它多聚物 (%)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	多聚物总量 (%)	1.0	0.4	0.5	1.3

[0188] 这些结果显示,冷冻/解冻循环期间hPM-1抗体二聚物的形成能通过添加非还原性二糖(蔗糖、海藻糖)显著地被抑制。

[0189] 实施例10:添加糖的影响(热应力试验)

[0190] 测试在热负荷过程中添加糖(非还原性二糖和非还原性三糖)对稳定性的影响。制备表14和15中所示的含糖样品,并在下列条件下进行热应力试验。

[0191] 用凝胶渗透色谱(GPC)测得的二聚物和多聚物的形成来评价热负荷过程中的稳定性。

[0192] 表14

[0193] (试验样品和结果)

		样品 47	样品 48	样品 49	样品 50
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5	0.5
磷酸钠 (mM)		15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5
添加剂 (mM)		-	蔗糖 145	海藻糖 145	棉子糖 145
[0194] 开始	二聚物 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
	其它多聚物 (%)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	多聚物总量 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
热应力试验 60°C - 14 天	二聚物 (%)	5.2	6.0	5.6	6.9
	其它多聚物 (%)	6.1	4.5	4.5	4.7
	多聚物总量 (%)	11.2	10.5	10.0	11.7

[0195] 这些结果显示,hPM-1抗体制剂中二聚物的总量和其它多聚物的形成能通过添加

非还原性二糖(蔗糖、海藻糖)显著地被抑制。

[0196] 表15

		样品 51	样品 52	样品 53	样品 54
抗-HM1.24 抗体 (mg/mL)		10	10	10	10
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0.25	0.25	0.25	0.25
醋酸盐 (mM)		30	30	30	30
pH		6.0	6.0	6.0	6.0
添加剂 (mM)		-	蔗糖 145	海藻糖 145	棉子糖 145
[0197] 开始	二聚物 (%)	2.8	2.8	2.8	2.8
	其它多聚物 (%)	0.5	0.5	0.5	0.5
	多聚物总量 (%)	3.3	3.3	3.3	3.3
热应力试验 60°C - 14 天	二聚物 (%)	9.2	10.4	9.5	9.9
	其它多聚物 (%)	5.6	2.9	4.1	4.3
	多聚物总量 (%)	14.8	13.3	13.6	14.2

[0198] 已显示,抗-HM1.24抗体制剂和hPM-1抗体制剂类似,其中的多聚物总量和其它多聚物的形成能通过添加非还原性二糖(蔗糖、海藻糖)显著地被抑制。

[0199] 实施例11:添加糖的影响(光加速试验)

[0200] 测试在光加速期间添加糖(非还原性二糖和非还原性三糖)对稳定性的影响。制备表16和17中所示的含糖样品,并在下列条件下进行光加速试验。

[0201] 用凝胶渗透色谱(GPC)测得的二聚物和多聚物的形成来评价光加速过程中的稳定性。

[0202] 表16

[0203] (试验样品和结果)

		样品 55	样品 56	样品 57	样品 58
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5	0.5
磷酸钠 (mM)		15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5
添加剂 (mM)		-	蔗糖 145	海藻糖 145	棉子糖 145
[0204] 开始	二聚物 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
	其它多聚物 (%)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	多聚物总量 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
光加速试验 1,200,000 Lux. hr	二聚物 (%)	3.5	2.5	3.2	3.5
	其它多聚物 (%)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	多聚物总量 (%)	3.5	2.5	3.2	3.5

[0205] 已显示,光诱导的hPM-1抗体的二聚作用能通过添加蔗糖显著地被抑制。

[0206] 表17

		样品 59	样品 60	样品 61	样品 62
抗-HM1.24 抗体 (mg/mL)		10	10	10	10
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0.25	0.25	0.25	0.25
醋酸盐 (mM)		30	30	30	30
pH		6.0	6.0	6.0	6.0
添加剂 (mM)		-	蔗糖 145	海藻糖 145	棉子糖 145
[0207] 开始	二聚物 (%)	2.8	2.8	2.8	2.8
	其它多聚物 (%)	0.5	0.5	0.5	0.5
	多聚物总量 (%)	3.3	3.3	3.3	3.3
光加速试验 1,200,000 Lux. hr	二聚物 (%)	3.8	4.1	3.4	3.1
	其它多聚物 (%)	2.8	0.8	2.8	2.9
	多聚物总量 (%)	6.6	4.9	6.2	6.0

[0208] 已显示,光诱导的抗-HM1.24抗体的交联能通过添加蔗糖显著地被抑制。

[0209] 实施例12:添加表面活性剂种类的影响

[0210] 测试表面活性剂种类对冷冻/解冻稳定性的影响。制备表18中所示的包含表面活性剂的样品并进行下列试验。

[0211] 用自动光阻塞颗粒计数器 (HIAC) 测得的每毫升微粒的数量来评价对冷冻/解冻循环(在-25℃冷冻/4℃解冻,共3个循环)的稳定性。

[0212] 表18

[0213] (试验样品和结果)

[0214]

		样品 63	样品 64	样品 65	样品 66	样品 67	样品 68	样品 69	样品 70	样品 71	样品 72	样品 73	样品 74
HPM-1 (mg/mL)		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
NaCl (mM)		250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
磷酸钠 (mM)		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
pH		7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
聚山梨醇 80 (mg/mL)		0	0.005	0.01	0.05	0.1	0	0	0	0	0	0	0
聚山梨醇 20 (mg/mL)		0	0	0	0	0	0.01	0.05	0.1	0	0	0	0
泊洛沙姆 188 (mg/mL)		0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.5	1	2
冷冻/解冻 (-25℃ → 4℃, 共 3 个循环)	10 μm 或更大 的微粒的数量 (微粒数/mL)	290	49	22	9	9	14	15	8	7	6	4	5
	25 μm 或更大 的微粒的数量 (微粒数/mL)	13	0	1	1	0	2	3	3	2	2	0	2

[0215] 已发现,在冷冻/解冻循环期间不溶性微粒的形成可以通过添加表面活性剂种类被显著地抑制(聚山梨醇80、聚山梨醇20、泊洛沙姆188)。