



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116867481 A

(43) 申请公布日 2023.10.10

(21) 申请号 202280015385.1

(22) 申请日 2022.02.17

(30) 优先权数据

63/150,510 2021.02.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2022/050424 2022.02.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/175663 EN 2022.08.25

(71) 申请人 艾瑞克有限公司

地址 英国萨弗伦沃尔登

(72) 发明人 J·耶热克 D·格林

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.

A61K 9/08 (2006.01)

权利要求书3页 说明书32页

(54) 发明名称

包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体的水性组合物

(57) 摘要

特别提供了一种pH在约4.0至约8.5的范围内的水溶液组合物,其包含:-包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;-任选一种或多种缓冲剂,所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内的可电离基团的物质,并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内;-任选一种或多种中性氨基酸;和-不带电荷的张力调节剂;其中缓冲剂以约0mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。

1. 一种pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:
 - 包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;
 - 任选一种或多种缓冲剂,所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内的可电离基团的物质,并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内;
 - 任选一种或多种中性氨基酸;和
 - 不带电荷的张力调节剂;其中缓冲剂以约0mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。
2. 根据权利要求1的水溶液组合物,其中缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在,如约0.1mM至约4mM、约0.1mM至约3mM或约0.1mM至约2mM或约0.1mM至约1mM。
3. 根据权利要求1的水溶液组合物,其中缓冲剂以约1mM至约5mM范围内的总浓度存在,如约1mM至约4mM或约1mM至约3mM。
4. 根据权利要求1的水溶液组合物,其中缓冲剂以 $<4.5\text{mM}$,如 $<4\text{mM}$ 、 $<3\text{mM}$ 、 $<2\text{mM}$ 、 $<1\text{mM}$ 、 $<0.5\text{mM}$ 、 $<0.4\text{mM}$ 、 $<0.3\text{mM}$ 、 $<0.2\text{mM}$ 或 $<0.1\text{mM}$ 的总浓度存在。
5. 根据权利要求1的水溶液组合物,其基本上不含缓冲剂。
6. 根据权利要求1的水溶液组合物,其中缓冲液以约5mM至约10mM的总浓度存在,如约5.5mM至约10mM、约6mM至约10mM、约6.5mM至约10mM、约7mM至约10mM、约7.5mM至约10mM、约8mM至约10mM、约8.5mM至约10mM或约9mM至约10mM。
7. 根据权利要求1至6任一项的水溶液组合物,其中缓冲剂包含 pK_a 在组合物的pH的1个pH单位内的可电离基团。
8. 根据权利要求1至4、6或7任一项的水溶液组合物,其中一种或多种缓冲剂选自柠檬酸盐、组氨酸、马来酸盐、亚硫酸盐、乙醛酸盐、阿斯巴甜、葡糖醛酸盐、天冬氨酸盐、谷氨酸盐、酒石酸盐、葡糖酸盐、乳酸盐、乙醇酸、腺嘌呤、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯乙酸盐、没食子酸盐、胞嘧啶、对氨基苯甲酸、山梨酸盐、乙酸盐、丙酸盐、藻酸盐、尿酸盐、2-(N-吗啉代)乙烷磺酸、碳酸氢盐、双(2-羟乙基)亚氨基三(羟甲基)甲烷、N-(2-乙酰氨基)-2-亚氨基二乙酸、2-[(2-氨基-2-氧代乙基)氨基]乙磺酸、哌嗪、N,N'-双(2-乙烷磺酸)、磷酸盐、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸、3-[N,N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙烷磺酸、三乙醇胺、哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙烷磺酸)、三(羟甲基)氨基甲烷、N-三(羟甲基)甘氨酸和N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸,及其盐,及其组合。
9. 根据权利要求8的水溶液组合物,其中缓冲剂选自柠檬酸盐、组氨酸、马来酸盐、酒石酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、乙酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐和N-三(羟甲基)氨基甲烷,例如选自柠檬酸盐和磷酸盐。
10. 根据权利要求1至9任一项的水溶液组合物,其中组合物的摩尔渗透压浓度在约200mOsm/L至约600mOsm/L的范围内,例如约200mOsm/L至约500mOsm/L、约200mOsm/L至约400mOsm/L,或约300mOsm/L。
11. 根据权利要求1至10任一项的水溶液组合物,其包含多元醇作为不带电荷的张力调节剂。
12. 根据权利要求1至10任一项的水溶液组合物,其包含选自甘油、1,2-丙二醇、甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖、PEG300和PEG400的不带电荷的张力调节剂,且特别是选自甘

油、甘露糖醇、1,2-丙二醇和蔗糖。

13. 根据权利要求1至12任一项的水溶液组合物,其中不带电荷的张力调节剂的总浓度为50-1000mM,如200-500mM,或约300mM。

14. 根据权利要求1至13任一项的水溶液组合物,其包含一种或多种选自甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺的中性氨基酸。

15. 根据权利要求15的水溶液组合物,其包含一种或多种选自甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸和丙氨酸的中性氨基酸。

16. 根据权利要求15的水溶液组合物,其包含脯氨酸作为中性氨基酸。

17. 根据权利要求15的水溶液组合物,其包含甘氨酸作为中性氨基酸。

18. 根据权利要求1至17任一项的水溶液组合物,其中组合物中一种或多种中性氨基酸的总浓度为20至200mM,例如50-150mM。

19. 根据权利要求1至18任一项的水溶液组合物,其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于10mM。

20. 根据权利要求1至19任一项的水溶液组合物,其中pH在约4.0至约7.5的范围内,如约5.0至约7.5,例如约5.5至约7.5,例如约6.0至约7.5,例如约7.0至约7.5。

21. 根据权利要求1至20任一项的水溶液组合物,其中工程化蛋白质构建体是Fc结构域与异源多肽的融合物。

22. 根据权利要求21的水溶液组合物,其中异源多肽选自细胞因子、生长因子、凝血因子、酶、受体蛋白、GLP-1激动剂及其功能片段和结构域。

23. 根据权利要求22的水溶液组合物,其中工程化蛋白质构建体选自依那西普、阿巴西普、贝拉西普、阿柏西普、利纳西普、罗米司亭、eloctate、鲁帕西普、度拉糖肽和阿普立克。

24. 根据权利要求22的水溶液组合物,其中异源多肽是蛋白酶抑制剂。

25. 根据权利要求1至20任一项的水溶液组合物,其中工程化蛋白质构建体是具有两个不同可变结合区的4-链抗体形式的双特异性抗体。

26. 根据权利要求1至20任一项的水溶液组合物,其中工程化蛋白质构建体是具有两个不同可变结合区的2-链抗体形式的双特异性抗体。

27. 根据权利要求1至26任一项的水溶液组合物,其中Fc结构域是IgG(例如IgG1)的Fc结构域。

28. 根据权利要求1至20或27中任一项的水溶液组合物,其中工程化蛋白质构建体包含IgG Fc结构域和两个或更多个免疫球蛋白链可变结构域。

29. 根据权利要求28的水溶液组合物,其中工程化蛋白质构建体包含由两条链形成的IgG Fc结构域,所述两条链各自与一个或多个(例如一个或两个)免疫球蛋白链可变结构域直接连接。

30. 根据权利要求28的水溶液组合物,其中工程化蛋白质构建体包含由两条链形成的IgG Fc结构域,所述两条链各自与一个或多个(例如一个或两个)免疫球蛋白链可变结构域间接连接。

31. 根据权利要求28至30中任一项的水溶液组合物,其中免疫球蛋白链可变结构域中的每一个具有相同的特异性。

32. 根据权利要求28至30任一项的水溶液组合物,其中构建体包含具有两种或更多种(例如两种)不同特异性的免疫球蛋白链可变结构域。

33. 根据权利要求28至32任一项的水溶液组合物,其中免疫球蛋白链可变结构域是 V_{HH} 结构域。

34. 根据权利要求28至32任一项的水溶液组合物,其中免疫球蛋白链可变结构域是 V_H 域。

35. 根据权利要求28至32中任一项的水溶液组合物,其中免疫球蛋白链可变结构域是 V_L 结构域。

36. 根据权利要求1至35中任一项的水溶液组合物,其中蛋白质以1至400mg/ml的浓度存在,例如10-200mg/ml,例如20-100mg/ml。

37. 根据权利要求1至36中任一项的水溶液组合物,其包含非离子表面活性剂。

38. 根据权利要求37的水溶液组合物,其中非离子表面活性剂选自烷基糖苷、聚山梨醇酯、聚乙二醇的烷基醚、聚乙二醇和聚丙二醇的嵌段共聚物和聚乙二醇的烷基苯基醚。

39. 根据权利要求37的水溶液组合物,其中非离子表面活性剂是聚山梨醇酯,如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。

40. 根据权利要求37至39任一项的水溶液组合物,其中非离子表面活性剂以10-2000 μ g/ml的浓度存在,如50-1000 μ g/ml、100-500 μ g/ml或约200 μ g/ml。

41. 根据权利要求1至40任一项的水溶液组合物,其包含防腐剂,如酚类或苄基防腐剂。

42. 根据权利要求41的水溶液组合物,其中酚类或苄基防腐剂选自苯酚、间甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸甲酯。

43. 根据权利要求41或权利要求42的水溶液组合物,其中防腐剂以10-100mM的浓度存在,如20-80mM或25-50mM。

44. 根据权利要求1至43任一项的水溶液组合物,其为用于治疗的组合物。

45. 根据权利要求1至44任一项的水溶液组合物,其为药物组合物。

包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体的水性组合物

[0001] 本发明涉及低缓冲剂浓度和低离子强度的包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体的水溶液组合物。

[0002] 背景

[0003] 包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体广泛用于治疗中。Fc结构域是抗体的C-末端区域,其与称为Fc受体的细胞表面受体和补体系统的一些蛋白质相互作用,从而激活免疫系统。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中,Fc结构域由两个相同的蛋白质链片段组成,每个片段衍生自抗体重链的第二和第三恒定结构域。在IgM和IgE抗体同种型中,Fc结构域由两个相同的蛋白质链片段组成,每个片段衍生自抗体重链的第二、第三和第四恒定结构域。Fc结构域的分子量通常可以在25-40kDa的范围内,并且在存在糖基化的情况下可以更大。由抗体Fc结构域结合介导的免疫系统的激活产生广泛的生理效应,包括肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的细胞裂解和脱粒。

[0004] 已经开发了各种工程化抗体蛋白质构建体,包括双特异性和三特异性抗体。还开发了许多工程化蛋白质构建体,其中与抗体分子的Fab部分(赋予抗原结合特异性的部分)分离的Fc可以用于与其生理目的不同的目的,特别是延长蛋白质构建体的体内半衰期的目的。

[0005] 配制成水溶液时,蛋白质是不稳定的,并且在储存时易于降解并因此失去生物活性。降解在性质上可以是物理的,包括聚集、沉淀或凝胶形成。降解在性质上也可以是化学的,包括水解裂解、脱酰胺、环酰亚胺形成、天冬氨酸/谷氨酸异构化或氧化。

[0006] 降解过程的速率随着温度升高而增加,并且蛋白质治疗分子通常在较低温度下更稳定。然而,开发在预期的保质期(通常24个月)的持续时间内以液体形式稳定的治疗性蛋白质产品通常是具有挑战性的,甚至是在冷藏下。此外,为了确保对患者的便利性,常常需要开发在升高的温度(如高达25°C或高达30°C)下稳定特定时间段或其整个保质期的产品。

[0007] 控制蛋白质治疗剂稳定性的最关键参数之一是pH。因此,pH优化是制剂开发中的关键步骤。许多治疗性蛋白质在4.0-8.5之间的选定pH下配制。认为重要的是确保pH保持在所选值并使pH波动最小化。因此,已经了解了制剂中需要一定程度的缓冲能力。由于在多肽主链的氨基酸侧链中存在可离子化基团,因此较大的蛋白质分子通常具有一些自我缓冲能力。

[0008] 本发明解决了包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体在水溶液组合物中的不稳定性问题。

[0009] W02006/138181A2(Amgen)公开了基本上不含其他缓冲剂的自缓冲蛋白质制剂。

[0010] W02009/073569(Abbott)公开了抗体(如阿达木单抗)的水性制剂,其中制剂具有小于约2.5mS/cm的电导率。

[0011] W02008/084237(Areacor)公开了不包含有意义量的常规缓冲剂的蛋白质组合物。利用“置换的缓冲剂”,其是在比组合物的pH小至少1个单位或高1个单位下具有pK_a值的添加剂。

[0012] W02018/094316(Just Biotherapeutics)公开了包含阿柏西普的眼用制剂。

[0013] W02013/059412和W02014/011629(Coherus)公开了依那西普的水性制剂。

[0014] 发明概述

[0015] 根据本发明,提供了一种pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0016] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0017] -任选一种或多种缓冲剂,所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内的可电离基团的物质,并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内;

[0018] -任选一种或多种中性氨基酸;和

[0019] -不带电荷的张力调节剂;

[0020] 其中缓冲剂以约0mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。

[0021] 发明详述

[0022] 本文描述了包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体的稳定的水溶液组合物,其不存在或具有低浓度的缓冲剂和低离子强度。

[0023] 应当注意到本文中对“pH”的所有提及是指在25°C下评估的组合物的pH。对“ pK_a ”的所有提及是指在25°C下评估的可电离基团的 pK_a (参见CRC Handbook of Chemistry and Physics,第79版,1998,D.R.Lide)。如果需要,可以使用合适的计算器估计多肽中存在的氨基酸侧链的 pK_a 值。

[0024] 本发明的发明人认为缓冲剂对包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体的稳定性具有不利影响。因此,应该尽可能地限制组合物中的缓冲剂的浓度。在某些实施方案中,需要最少量的缓冲剂来维持稳定的组合物和最小化pH波动。

[0025] 存在时,缓冲剂将在组合物的pH下具有缓冲能力。缓冲剂通常包含 pK_a 在组合物的pH的1个pH单位内的可电离基团,然而,具有 pK_a 大于或小于组合物pH的1个pH单位的可电离基团的部分如果以足够的量存在也可以提供一些缓冲作用。在一个实施方案中,该(或一种)缓冲剂包含 pK_a 在组合物的pH的1个pH单位内的可电离基团。在另一个实施方案中,该(或一种)缓冲剂包含 pK_a 在组合物的pH的1.5个pH单位内(例如组合物的pH的1至1.5个pH单位之间)的可电离基团。在再一个实施方案中,该(或一种)缓冲剂包含 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内(例如组合物的pH的1.5至2个pH单位之间)的可电离基团。

[0026] 在一个实施方案中,组合物基本上不含缓冲剂,例如不含任何缓冲剂。在一个实施方案中,组合物含有单一缓冲剂。在一个实施方案中,组合物含有两种缓冲剂。合适地,存在一种或多种缓冲液。

[0027] 在一个实施方案中,组合物中缓冲剂的总浓度小于4.5mM,如小于4mM、小于3mM、小于2mM、小于1mM、小于0.5mM、小于0.4mM、小于0.3mM或小于0.2mM或小于0.1mM。在一个实施方案中,缓冲剂的总浓度在约0.1mM至约5mM的范围内,如约0.5mM至约5mM、约0.1mM至约4mM、约0.5mM至约4mM、约0.1mM至约3mM、约0.5mM至约3mM、约0.1mM至约2mM、约0.5mM至约2mM、约0.1mM至约1mM或约0.5mM至约1mM。在一个实施方案中,缓冲剂的总浓度在约1mM至约5mM、约1mM至约4mM或约1mM至约3mM的范围内。在一个实施方案中,组合物中缓冲剂的总浓度 $<4.5mM$,如 $<4mM$ 、 $<3mM$ 、 $<2mM$ 、 $<1mM$ 、 $<0.5mM$ 、 $<0.4mM$ 、 $<0.3mM$ 、 $<0.2mM$ 或 $<0.1mM$ 。在一个实施方案中,水溶液组合物基本上不含缓冲剂。如本文所用,“基本上不含”是指水溶液组合物含有小于0.1mM的缓冲剂。考虑溶液中缓冲剂的浓度时,应当排除工程化蛋白质构建体本身的

任何缓冲能力。

[0028] 在一个实施方案中,缓冲剂以约1mM至约5mM范围内的总浓度存在,如约1mM至约4mM、约1mM至约3mM或约1mM至约2mM。在一个实施方案中,缓冲剂以约1.5mM至约5mM范围内的总浓度存在于组合物中,如1.5mM至约4mM、约1.5mM至约3mM或约1.5mM至约2mM。在一个实施方案中,缓冲剂以约2mM至约4mM或约2mM至约3mM范围内的总浓度存在于组合物中。在一个实施方案中,缓冲剂以约3.5mM至约4mM范围内的总浓度存在于组合物中。

[0029] 在一个实施方案中,缓冲剂以约5mM至约10mM范围内的总浓度存在,如约5.5mM至约10mM、约6mM至约10mM、约6.5mM至约10mM、约7mM至约10mM、约7.5mM至约10mM、约8mM至约10mM、约8.5mM至约10mM或约9mM至约10mM。在一个实施方案中,缓冲剂以约5mM至约9.5mM范围内的总浓度存在,如约5.5mM至约9.5mM、约6mM至约9.5mM、约6.5mM至约9.5mM、约7mM至约9.5mM、约7.5mM至约9.5mM、约8mM至约9.5mM或约8.5mM至约9.5mM。在一个实施方案中,缓冲剂以约5mM至约9mM范围内的总浓度存在,如约5.5mM至约9mM、约6mM至约9mM、约6.5mM至约9mM、约7mM至约9mM、约7.5mM至约9mM或约8mM至约9mM。在一个实施方案中,缓冲剂以约5mM至约8.5mM的总浓度存在,如约5.5mM至约8.5mM、约6mM至约8.5mM、约6.5mM至约8.5mM、约7mM至约8.5mM或约7.5mM至约8.5mM。在一个实施方案中,缓冲剂以约5mM至约8mM,如约5.5mM至约8mM、约6mM至约8mM、约6.5mM至约8mM或约7mM至约8mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约5mM至约7.5mM的总浓度存在,如约5.5mM至约7.5mM、约6mM至约7.5mM或约6.5mM至约7.5mM。在一个实施方案中,缓冲剂以约5mM至约7mM范围内的总浓度存在,如约5.5mM至约7mM,或约6mM至约7mM。在一个实施方案中,缓冲剂以约5mM至约6.5mM范围内的总浓度存在,如约5.5mM至约6.5mM。在一个实施方案中,缓冲剂以约5mM至约6mM范围内的总浓度存在。

[0030] 在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约10mM、约3.5mM至约9.5mM、约4mM至约9mM、约4.5mM至约8.5mM、约5mM至约8mM、约5.5mM至约7.5mM或约6mM至约7mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3.5mM至约10mM、约4mM至约10mM、约4.5mM至约10mM、约5mM至约10mM、约5.5mM至约10mM或约6mM至约10mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约9.5mM、约3.5mM至约9.5mM、约4mM至约9.5mM、约4.5mM至约9.5mM、约5mM至约9.5mM、约5.5mM至约9.5mM或约6mM至约9.5mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约9mM、约3.5mM至约9mM、约4mM至约9mM、约4.5mM至约9mM、约5mM至约9mM、约5.5mM至约9mM或约6mM至约9mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约8.5mM、约3.5mM至约8.5mM、约4mM至约8.5mM、约4.5mM至约8.5mM、约5mM至约8.5mM、约5.5mM至约8.5mM或约6mM至约8.5mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约8mM、约3.5mM至约8mM、约4mM至约8mM、约4.5mM至约8mM、约5mM至约8mM、约5.5mM至约8mM或约6mM至约8mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约7.5mM、约3.5mM至约7.5mM、约4mM至约7.5mM、约4.5mM至约7.5mM、约5mM至约7.5mM、约5.5mM至约7.5mM或约6mM至约7.5mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约7mM、约3.5mM至约7mM、约4mM至约7mM、约4.5mM至约7mM、约5mM至约7mM、约5.5mM至约7mM或约6mM至约7mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约6.5mM、约3.5mM至约6.5mM、约4mM至约6.5mM、约4.5mM至约6.5mM、约5mM至约6.5mM或约5.5mM至约6.5mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约6mM、约

3.5mM至约6mM、约4mM至约6mM、约4.5mM至约6mM或约5mM至约6mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约5.5mM、约3.5mM至约5.5mM、约4mM至约5.5mM或约4.5mM至约5.5mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约5mM、约3.5mM至约5mM或约4mM至约5mM范围内的总浓度存在。在一个实施方案中,缓冲剂以约3mM至约4.5mM或约3.5mM至约4.5mM范围内的总浓度存在。

[0031] 如果加入酸,水溶液的pH降低,如果加入碱,水溶液的pH增加。在给定的温度和大气压下,加入酸时pH降低的幅度或加入碱时pH增加的幅度取决于(1)加入的酸或碱的量,(2)水溶液的起始pH(即在加入酸或碱之前)和(3)缓冲剂的存在。因此,(1)从给定的pH开始,添加更大量的酸或碱将导致更大幅度的pH变化,(2)添加给定量的酸或碱将导致在中性pH(即pH 7.0)下最大的pH变化,并且pH变化的幅度将随着起始pH远离pH 7.0而减小,以及(3)从给定pH开始的pH变化的幅度在存在缓冲剂的情况下比不存在缓冲剂的情况下更小。因此,如果向溶液中加入酸或碱,则缓冲剂具有减少pH变化的能力。

[0032] 合适地,加入强酸或强碱导致溶液中的酸或碱增加0.1mM时,如果与不包含缓冲剂的相同溶液相比,物质能够将溶液的pH变化幅度降至75%,优选50%,最优选至25%,则认为该物质是缓冲剂。

[0033] 相反,合适地,加入强酸或强碱导致溶液中的酸或碱增加0.1mM时,如果与不包含物质的相同溶液相比,该物质不能将溶液的pH变化幅度降至75%、优选50%、最优选至25%,则不认为该物质是缓冲剂。

[0034] 在一个实施方案中,该或一种缓冲剂是氨基酸。在另一个实施方案中,该或缓冲剂不是氨基酸。在一个实施方案中,组合物不含氨基酸赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸和天冬氨酸。在一个实施方案中,组合物不含半胱氨酸。

[0035] 存在时,合适的缓冲剂包括但不限于:柠檬酸盐、组氨酸、马来酸盐、亚硫酸盐、乙醛酸盐、阿斯巴甜、葡糖醛酸盐、天冬氨酸盐、谷氨酸盐、酒石酸盐、葡糖酸盐、乳酸盐、乙醇酸(glycolic acid)、腺嘌呤、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯乙酸盐、没食子酸盐、胞嘧啶、对氨基苯甲酸、山梨酸盐、乙酸盐、丙酸盐、藻酸盐、尿酸盐、2-(N-吗啉代)乙烷磺酸、碳酸氢盐、双(2-羟乙基)亚氨基三(羟甲基)甲烷、N-(2-乙酰氨基)-2-亚氨基二乙酸、2-[(2-氨基-2-氧代乙基)氨基]乙磺酸、哌嗪、N,N'-双(2-乙烷磺酸)、磷酸盐、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基苯磺酸、3-[N,N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙烷磺酸、三乙醇胺、哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙烷磺酸)、三(羟甲基)氨基甲烷、N-三(羟甲基)甘氨酸和N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸,及其盐,及其组合。在一个实施方式中,缓冲剂选自组氨酸、马来酸盐、亚硫酸盐、乙醛酸盐、阿斯巴甜、葡糖醛酸盐、天冬氨酸盐、谷氨酸盐、酒石酸盐、葡糖酸盐、乳酸盐、乙醇酸、腺嘌呤、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯乙酸盐、没食子酸盐、胞嘧啶、对氨基苯甲酸、山梨酸盐、乙酸盐、丙酸盐、藻酸盐、尿酸盐、2-(N-吗啉代)乙烷磺酸、碳酸氢盐、双(2-羟乙基)亚氨基三(羟甲基)甲烷、N-(2-乙酰氨基)-2-亚氨基二乙酸、2-[(2-氨基-2-氧代乙基)氨基]乙磺酸、哌嗪、N,N'-双(2-乙烷磺酸)、磷酸盐、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸、3-[N,N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸、三乙醇胺、哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙磺酸)、三(羟甲基)氨基甲烷、N-三(羟甲基)甘氨酸和N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸,及其盐,及其组合。在一个实施方式中,缓冲剂选自在一个实施方案中,缓冲剂选自柠檬酸盐、马来酸盐、亚硫酸盐、乙醛酸盐、阿斯巴甜、葡糖醛酸盐、酒石酸盐、葡糖酸盐、乳酸盐、乙醇酸、

腺嘌呤、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯乙酸盐、没食子酸盐、胞嘧啶、对氨基苯甲酸、山梨酸盐、乙酸盐、丙酸盐、藻酸盐、尿酸盐、2-(N-吗啉代)乙烷磺酸、碳酸氢盐、双(2-羟乙基)亚氨基三(羟甲基)甲烷、N-(2-乙酰氨基)-2-亚氨基二乙酸、2-[(2-氨基-2-氧乙基)氨基]乙烷磺酸、哌嗪、N,N'-双(2-乙磺酸)、磷酸盐、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸、3-[N,N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸、三乙醇胺、哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙磺酸)、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、N-三(羟甲基)甘氨酸和N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸,及其盐,及其组合。在一个实施方案中,缓冲剂选自柠檬酸盐、组氨酸、马来酸盐、酒石酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、乙酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐和三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS),如选自组氨酸、马来酸盐、酒石酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、乙酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐和三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS),特别是组氨酸、乳酸盐、乙酸盐、磷酸盐和三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)。例如,缓冲剂是磷酸盐。或者,缓冲剂是三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)。或者,缓冲剂是组氨酸。或者,缓冲剂是乳酸盐。或者,缓冲剂是乙酸盐。或者,缓冲剂是柠檬酸盐。

[0036] 在一个实施方案中,组合物不包含磷酸钠。在一个实施方案中,如果组合物包含磷酸盐缓冲剂(例如磷酸钠),则合适地浓度小于4.5mM,例如小于4.0mM。

[0037] 本发明的组合物的主要溶剂是水,如注射用水。组合物的其他组分(例如多元醇)可有助于工程化蛋白质构建体的溶解。

[0038] 组合物包含不带电荷的张力调节剂,如多元醇。不带电荷的张力调节剂的实例包括甘油、1,2-丙二醇、甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖、PEG300和PEG400。合适地,不带电荷的张力调节剂选自甘油、甘露糖醇、1,2-丙二醇和蔗糖。包括时,不带电荷的张力调节剂的总浓度合适地为50-1000mM,例如200-500mM,如约300mM。

[0039] 组合物适当地具有生理上可接受的摩尔渗透压浓度,且因此适合于肠胃外施用。因此,组合物的摩尔渗透压浓度合适地在约200mOsm/L至约600mOsm/L的范围内,例如约200mOsm/L至约500mOsm/L、约200mOsm/L至约400mOsm/L或约300mOsm/L。

[0040] 在一个实施方案中,组合物的摩尔渗透压浓度在约200mOsm/L至约550mOsm/L的范围内,例如约200mOsm/L至约500mOsm/L、约200mOsm/L至约450mOsm/L、约200mOsm/L至约400mOsm/L、约200mOsm/L至约350mOsm/L,或约200mOsm/L至约300mOsm/L。在一个实施方案中,组合物的摩尔渗透压浓度在约250mOsm/L至约600mOsm/L,例如约300mOsm/L至约600mOsm/L、约350mOsm/L至约600mOsm/L、约400mOsm/L至约600mOsm/L、约450mOsm/L至约600mOsm/L,或约500mOsm/L至约600mOsm/L。该组合物例如与人血浆等渗。组合物还可以是低渗的或高渗的,例如旨在在施用前稀释的那些。在一个实施方案中,组合物是略微高渗的。在一个实施方案中,组合物的摩尔渗透压浓度在约300mOsm/L至约500mOsm/L的范围内,如约350mOsm/L至约500mOsm/L,如约400mOsm/L至约500mOsm/L。

[0041] 组合物可任选包含一种或多种中性氨基酸。如本文所用,中性氨基酸是其侧链不含在组合物的pH下显著电离的可电离基团(例如超过20%,特别是超过50%的侧链具有负电荷或正电荷)的氨基酸。示例性中性氨基酸选自甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺,且特别是其L异构体。

[0042] 合适地,中性氨基酸选自甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸和丙氨酸,特别是选自脯氨酸和甘氨酸,尤其是脯氨酸。

[0043] 存在时,一种或多种中性氨基酸的总浓度可以是例如20-250mM,例如20-200mM,例如50-150mM,例如50-100mM或25-75mM。或者,可以是100-250mm,例如150-200mm。

[0044] 本发明的发明人认为离子的存在对包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体的稳定性具有不利影响。因此,应该尽可能地限制组合物的离子强度。

[0045] 除了工程化蛋白质构建体的贡献之外,组合物的总离子强度小于20mM,合适地小于10mM,例如小于9mM、小于8mM、小于7mM、小于6mM或小于5mM。术语“总离子强度”在本文中用作溶液中所有离子浓度的以下函数:

$$[0046] \quad I = \sum_{X=1}^n c_x z_x^2 / 2$$

[0047] 其中 C_x 是离子X的摩尔浓度(mol L^{-1}), Z_x 是离子 C_x 的净电荷。总和涵盖溶液中存在的所有离子(n),不包括工程化蛋白质构建体的贡献。应当理解,任选的中性氨基酸在本发明的组合物中具有零的净电荷,且因此对总离子强度没有贡献。在任何情况下,不包括任何中性氨基酸的贡献。

[0048] 组合物的pH在约4.0至约8.5的范围内,如约4.0至约7.5或约5.0至约8.5,例如约6.0至约8.5,例如约6.5至约8.5或约6.0至约7.5,如约7.0至约7.5。其他感兴趣的范围包括约5.0至约8.0,例如约5.0至约7.5,例如约5.5至约7.5,尤其是约6.0至约7.5。

[0049] 在一个实施方案中,组合物的pH在约4.0至约8.5的范围内,如约4.0至约8.0、约4.0至约7.5、约4.0至约7.0、约4.0至约6.5、约4.0至约6.0、约4.0至约5.5或约4.0至约5.0。在一个实施方案中,组合物的pH在约4.5至约8.5的范围内,如约4.5至约8.5、约4.5至约7.5、约4.5至约7.0、约4.5至约6.5、约4.5至约7.5,或约4.5至约5.5。在一个实施方案中,组合物的pH在约5.0至约8.5的范围内,如约5.0至约8.0、约5.0至约7.5、约5.0至约7.0、约5.0至约6.5或约5.0至约6.0。在一个实施方案中,组合物的pH在约5.5至约8.5的范围内,如约5.5至约8.0、约5.5至约7.5、约5.5至约7.0或约5.5至约6.5。在一个实施方案中,组合物的pH在约6.0至约8.5的范围内,如约6.0至约7.5,或约6.0至约7.0。

[0050] 本发明的组合物包含工程化蛋白质构建体。工程化蛋白质构建体是通常作为基因工程(基因融合)或合成化学的产物制备的非天然蛋白质。工程化蛋白质构建体在一个完整蛋白质构建体中组合了最初存在于两种或更多种单独蛋白质(和/或编码单独蛋白质的单独基因)中的潜在有益特性。例如,Fc结构域可以与具有特定期望生物学功能的蛋白质(例如GLP-1激动剂)连接(即融合),保护其免于酶促降解,从而增加其循环半衰期。或者,两个或更多个抗原结合免疫球蛋白结构域可以直接或通过另外的结构域与Fc结构域连接(即融合),以产生具有多价和/或特异性的工程化抗体。虽然使用基因工程或合成化学的原理对蛋白质结构的这种人工操纵通常产生具有高度期望的用于疾病治疗的生理特性的工程化构建体,但它通常导致新产生的蛋白质的表面处的结构基序的非天然暴露,如大范围的疏水性斑块或通常不会暴露的其他不稳定性热点。这又导致工程化蛋白质构建体的稳定性受损,如增加的聚集倾向。本发明解决了工程化蛋白质构建体的这种增加的不稳定性。

[0051] 完全人单特异性抗体(和其他非人物种的天然抗体),即使通过在异源宿主(如细菌或真菌)中表达而产生时,也不包括在术语“工程化蛋白质构建体”中。由经工程化以具有人免疫系统的非人动物(如小鼠)产生的人单特异性抗体也不包括在术语“工程化蛋白质构建体”中。例如,阿达木单抗(adalimumab)不是工程化的蛋白质构建体。在一个实施方案中,

工程化蛋白质构建体不是嵌合抗体,特别是不是单特异性嵌合抗体。在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体不是人源化抗体,特别是不是单特异性人源化抗体。

[0052] 本发明的工程化蛋白质构建体包含Fc结构域。Fc结构域是与Fc受体或补体系统的一些蛋白质相互作用以激活免疫系统的抗体结构域,并且包括其衍生物。Fc结构域可以衍生自例如IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA(例如IgA1或IgA2)、IgD、IgM、IgY和IgE同种型。衍生自IgG、IgA和IgD同种型的Fc结构域包含通过二硫键连接的两个相同的蛋白质链片段,其各自衍生自抗体重链的第二和第三恒定结构域。衍生自IgM和IgE同种型的Fc结构域包含通过二硫键连接的三个相同的蛋白质链片段,其各自衍生自抗体重链的第二、第三和第四恒定结构域。Fc结构域可以任选是糖基化的。最合适地,Fc结构域是IgG,尤其是IgG1或IgG4,特别是IgG1的Fc结构域。Fc结构域通常可以具有25-40kDa的分子量,其在糖基化Fc结构域的情况下可以更高。该术语所涵盖的Fc结构域的衍生物包括称为Fcab的结构域,其中Fc结构域被修饰以包括抗原结合位点(参见Protein Engineering, Design and Selection (2017) 30 (9) 657-671)。衍生物的其他实例包括缀合衍生物,例如包含与另一部分缀合的Fc结构域的工程化蛋白质构建体。此类部分包括化学惰性聚合物,如PEG。在一些实施方案中,Fc结构域含有一种或多种改变工程化蛋白质构建体的一种或多种性质的修饰,所述性质如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或效应子功能(例如抗原依赖性细胞毒性)。

[0053] 在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体是Fc结构域与异源多肽的融合物。Fc结构域的一条链和优选两条链与异源多肽连接(即融合)。异源多肽是在与Fc结构域或其链的连续序列中不天然存在的多肽,特别是不是抗体的抗原结合部分(即Fab部分)。合适地,Fc结构域的每条链与相同的异源多肽连接(即融合),使得工程化蛋白质构建体是同型二聚体。

[0054] 在一个实施方案中,异源多肽能够结合配体,优选特异性配体。异源多肽可以能够与另一种蛋白质相互作用,例如在人体中起作用的蛋白质(如但不限于细胞因子)。在一个实施方案中,异源多肽选自细胞因子、生长因子、凝血因子、酶、受体蛋白、GLP-1激动剂及其功能性片段和结构域。

[0055] 在一个实施方案中,异源多肽能够结合肿瘤坏死因子(TNF),例如TNF α ,并且例如可以包含TNF受体,例如TNF受体2,尤其是其可溶形式。在一个实施方案中,异源多肽能够结合膜蛋白,如CD80或CD86,并且例如包含CLTA-4的胞外结构域或其部分。在一个实施方案中,异源多肽能够结合VEGF,并且例如包含VEGFR1和/或VEGFR2的胞外结构域或其部分。在一个实施方案中,异源多肽能够结合IL-1并且例如包含白细胞介素(如IL-1R1和/或IL-1RAcP)的胞外结构域或其部分。在一个实施方案中,异源多肽能够结合血小板生成素受体,如c-Mpl。在一个实施方案中,异源多肽是凝血因子,如因子VIII或因子IX或其部分。在一个实施方案中,异源多肽是hActRIIb蛋白或其衍生物。在一个实施方案中,异源多肽是蛋白酶抑制剂。在一个实施方案中,异源多肽是GLP-1激动剂。

[0056] 含有Fc结构域的示例性工程化蛋白质构建体包括依那西普(etanercept)、阿巴西普(abatacept)、贝拉西普(belatacept)、阿柏西普(aflibercept)、利纳西普(riloncept)、罗米司亭(romiplostim)、eloctate、鲁帕西普(luspatercept)、度拉糖肽(dulaglutide)和阿普立克(alprolix)。在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体是度拉糖

肽。在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体是阿巴西普。在一个实施方式中,工程化蛋白质构建体是阿柏西普。在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体是依那西普。

[0057] 在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体包含抗体的抗原结合部分(即Fab部分)。在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体是具有两个不同可变结合区的4-链抗体形式的双特异性抗体。在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体是具有两个不同可变结合区的双链抗体(即仅有重链的抗体)形式的双特异性抗体。仅有重链的抗体可以例如衍生自分离自骆驼科动物的抗体。无论是2-链还是4-链形式,这种双特异性抗体可以例如具有表示为CDR1a、CDR2a、CDR3a、CDR1b、CDR2b和CDR3b的抗体的臂a和b的一对3个CDR,其中CDR1a与CDR1b不同和/或CDR2a与CDR2b不同和/或CDR3a与CDR3b不同。合适地,6个CDR中没有一个是与6个CDR中的任何其他CDR相同。

[0058] 在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体是Fcab形式的双特异性抗体或三特异性抗体,其中Fc结构域已被修饰以包括抗原结合位点。

[0059] 在某些实施方案中,两个工程化蛋白质构建体可以例如通过二硫键缔合以形成二聚蛋白质。

[0060] 在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体包含IgG Fc结构域和两个或更多个(例如两个、三个、四个、五个或六个,如两个或四个)免疫球蛋白链可变结构域。如本文所用,免疫球蛋白链可变结构域是衍生自抗体的与抗原结合的结构域。免疫球蛋白链可变结构域可以直接连接Fc结构域,或者可以间接连接Fc结构域,例如通过间插恒定结构域。免疫球蛋白链可变结构域的特异性由CDR决定,并且免疫球蛋白链可变结构域通常具有三个CDR。示例性免疫球蛋白链可变结构域包括衍生自常规4链抗体的 V_H 和 V_L 结构域以及衍生自仅重链抗体的 V_{HH} 结构域,例如,如在骆驼科动物中发现的。在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体包含由两条链形成的IgG Fc结构域,每条链与一个或多个(例如一个、两个或三个,如一个或两个)免疫球蛋白链可变结构域直接或间接连接。在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体包含由两条链形成的IgG Fc结构域,每条链直接与一个或多个(例如一个或两个)免疫球蛋白链可变结构域连接。如本文所用,“直接连接”是指任选通过肽接头直接连接(即融合),并且没有任何不是免疫球蛋白链可变结构域(例如恒定结构域)的间插结构域。在一个实施方案中,工程化蛋白质构建体包含由两条链形成的IgG Fc结构域,每条链与一个或多个(例如一个或两个)免疫球蛋白链可变结构域间接连接。如本文所用,“间接连接”意指与一个或多个间插结构域(例如恒定结构域)连接(即融合)。肽接头可以存在于各种结构域之间。在一个实施方案中,每个免疫球蛋白链可变结构域具有相同的特异性(即工程化蛋白质构建体是单特异性的),例如每条免疫球蛋白链可变结构域是相同的。在一个实施方案中,构建体包含具有两种或更多种(例如两种)不同特异性的免疫球蛋白链可变结构域(即工程化蛋白质构建体是多特异性的,例如双特异性的),例如至少两个免疫球蛋白链可变结构域不相同。

[0061] 工程化蛋白质构建体优选是治疗性工程化蛋白质构建体。这种工程化蛋白质构建体具有期望的治疗或预防活性,并且指示用于治疗、抑制或预防疾病或医学病症。在某些实施方案中,工程化蛋白质构建体基本上是纯的,即,组合物包含单一工程化蛋白质构建体并且没有显著量的任何另外的蛋白质。在优选的实施方案中,工程化蛋白质构建体占组合物的总蛋白质含量的至少99%,优选至少99.5%,更优选至少约99.9%。在优选的实施方案

中,工程化蛋白质构建体足够纯以用于药物组合物中。

[0062] 工程化蛋白质构建体合适地以约1-400mg/ml,合适地10-200mg/ml,更合适地20-100mg/ml,例如约50mg/ml的浓度存在于组合物中。

[0063] 组合物可包含非离子表面活性剂。非离子表面活性剂可以例如选自聚山梨醇酯、烷基糖苷、聚乙二醇的烷基醚、聚乙二醇和聚丙二醇的嵌段共聚物和聚乙二醇的烷基苯基醚。

[0064] 特别合适的一类非离子表面活性剂是聚山梨醇酯(乙氧基化脱水山梨糖醇的脂肪酸酯),如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。聚山梨醇酯20是由月桂酸和聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇形成的单酯,其中数字20表示分子中氧乙烯基团的数目。聚山梨醇酯80是由油酸和聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇形成的单酯,其中数字20表示分子中氧乙烯基团的数目。聚山梨醇酯20以一系列商品名已知,包括特别是吐温20,以及还有Alkest TW 20。聚山梨醇酯80以一系列商品名已知,包括特别是吐温80以及还有Alkest TW 80。其他合适的聚山梨醇酯包括聚山梨醇酯40和聚山梨醇酯60。

[0065] 另一类合适的非离子表面活性剂是烷基糖苷,尤其是十二烷基麦芽糖苷。其它烷基糖苷包括十二烷基葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷、辛基麦芽糖苷、癸基葡萄糖苷、癸基麦芽糖苷、十三烷基葡萄糖苷、十三烷基麦芽糖苷、十四烷基葡萄糖苷、十四烷基麦芽糖苷、十六烷基葡萄糖苷、十六烷基麦芽糖苷、蔗糖单辛酸酯、蔗糖单癸酸酯、蔗糖单十二烷酸酯、蔗糖单十三烷酸酯、蔗糖单十四烷酸酯和蔗糖单十六烷酸酯。

[0066] 另一类合适的非离子表面活性剂是聚乙二醇的烷基醚,尤其是以商品名Brij已知的那些,如选自聚乙二醇(2)十六烷基醚(Brij 52)、聚乙二醇(2)油基醚(Brij 93)和聚乙二醇(2)十二烷基醚(Brij 14)。其它合适的Brij表面活性剂包括聚乙二醇(4)月桂基醚(Brij 30)、聚乙二醇(10)月桂基醚(Brij 35)、聚乙二醇(20)十六烷基醚(Brij 58)和聚乙二醇(10)硬脂基醚(Brij 78)。

[0067] 另一类合适的非离子表面活性剂是聚乙二醇和聚丙二醇的嵌段共聚物,也称为泊洛沙姆,尤其是泊洛沙姆188、泊洛沙姆407、泊洛沙姆171和泊洛沙姆185。泊洛沙姆也以商品名Pluronic或Koliphors已知。例如,泊洛沙姆188以Pluronic F-68销售。

[0068] 另一类合适的非离子表面活性剂是聚乙二醇的烷基苯基醚,尤其是4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇,也以商品名Triton X-100已知。

[0069] 在一个实施方案中,非离子表面活性剂是聚山梨醇酯或泊洛沙姆,并且合适地是聚山梨醇酯。组合物中非离子表面活性剂的浓度通常在10-2000 μ g/ml范围内,如50-1000 μ g/ml、100-500 μ g/ml或约200 μ g/ml。

[0070] 本发明的组合物可另外包含防腐剂,如酚类或苄基防腐剂。防腐剂合适地选自苯酚、间甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸甲酯,特别是苯酚、间甲酚和苯甲醇。防腐剂的浓度通常为10-100mM,例如20-80mM,如25-50mM。选择组合物中防腐剂的浓度以确保组合物通过药典抗微生物有效性测试(USP,第32卷)。

[0071] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0072] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0073] -任选一种或多种缓冲剂,所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内

的可电离基团的物质,并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内;

[0074] -一种或多种中性氨基酸;和

[0075] -不带电荷的张力调节剂;

[0076] 其中缓冲剂以约0mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。在一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约1mM至约3mM。在另一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约5.5mM至约10mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约5.5mM至约8mM。

[0077] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约6.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0078] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0079] -任选一种或多种缓冲剂,所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约4.0至约9.5范围内的(例如,约5.0至约9.5)的可电离基团的物质,并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内,例如,在1.5个pH单位内,例如,在1个pH单位内;

[0080] -任选一种或多种中性氨基酸;和

[0081] -不带电荷的张力调节剂;

[0082] 其中缓冲剂以约0mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。在一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约1mM至约3mM。在另一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约5.5mM至约10mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约5.5mM至约8mM。

[0083] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0084] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体,其是具有两个不同的可变结合区的2-链抗体形式的双特异性抗体;

[0085] -任选一种或多种缓冲剂,所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内的可电离基团的物质,并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内,例如,在1.5个pH单位内,例如,在1个pH单位内;

[0086] -任选一种或多种中性氨基酸;和

[0087] -不带电荷的张力调节剂,例如,多元醇;

[0088] 其中缓冲剂以约0mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。在一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约0mM至约5mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约1mM至约3mM。在另一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约5.5mM至约10mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约5.5mM至约8mM。

[0089] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0090] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0091] -任选一种或多种缓冲剂,所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内

的可电离基团的物质,并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内;

[0092] -一种或多种中性氨基酸;和

[0093] -不带电荷的张力调节剂,例如,多元醇;和

[0094] -非离子表面活性剂;

[0095] 其中缓冲剂以约0mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。在一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约1mM至约3mM。在另一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约5.5mM至约10mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约5.5mM至约8mM。

[0096] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0097] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0098] -任选一种或多种缓冲剂,所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内的可电离基团的物质,并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内;

[0099] -一种或多种中性氨基酸,例如,选自甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸和丙氨酸;和

[0100] -不带电荷的张力调节剂,例如,多元醇;和

[0101] -防腐剂

[0102] 其中缓冲剂以约0mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。在一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约1mM至约3mM。在另一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约5.5mM至约10mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约5.5mM至约8mM。

[0103] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0104] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体,其是Fc结构域与选自细胞因子、生长因子、凝血因子、酶、受体蛋白、GLP-1激动剂及其功能性片段和结构域的异源蛋白质的融合物;

[0105] -任选一种或多种缓冲剂,所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内的可电离基团的物质,并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内;

[0106] -任选一种或多种中性氨基酸;和

[0107] -不带电荷的张力调节剂,例如,多元醇;

[0108] 其中缓冲剂以约0mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。在一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约1mM至约3mM。在另一个具体的子实施方案中,一种或多种缓冲剂以约5.5mM至约10mM范围内的总浓度存在于所述组合物中,如约5.5mM至约8mM。

[0109] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0110] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体,其是具有两个不同的可变结合区的4-链

形式的双特异性抗体；

[0111] -任选一种或多种缓冲剂，所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内的可电离基团的物质，并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内；

[0112] -任选一种或多种中性氨基酸；和

[0113] -不带电荷的张力调节剂，例如，多元醇；

[0114] 其中缓冲剂以约0mM至约5mM范围内的总浓度存在于组合物中；并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献，组合物的总离子强度小于20mM。在一个具体的子实施方案中，一种或多种缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于所述组合物中，如约1mM至约3mM。

[0115] 在一个实施方案中，本发明提供了pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物，其包含：

[0116] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体，其是具有两个不同的可变结合区的2-链形式的双特异性抗体；

[0117] -任选一种或多种缓冲剂，所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内的可电离基团的物质，并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内；

[0118] -任选一种或多种中性氨基酸；和

[0119] -不带电荷的张力调节剂，例如，多元醇；

[0120] 其中缓冲剂以约0mM至约5mM范围内的总浓度存在于组合物中；并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献，组合物的总离子强度小于20mM。在一个具体的子实施方案中，一种或多种缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于所述组合物中，如约1mM至约3mM。

[0121] 在一个实施方案中，本发明提供了pH在约6.0至约7.5范围内的水溶液组合物，其包含：

[0122] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体，其是具有两个不同的可变结合区的2-链形式的双特异性抗体；

[0123] -任选一种或多种缓冲剂，所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约5.0至约8.5范围内的可电离基团的物质，并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内，例如，1.5个pH单位内，1个pH单位内；

[0124] -任选一种或多种中性氨基酸；和

[0125] -不带电荷的张力调节剂，例如，多元醇；

[0126] 其中缓冲剂以约0mM至约5mM范围内的总浓度存在于组合物中；并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献，组合物的总离子强度小于20mM。在一个具体的子实施方案中，一种或多种缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于所述组合物中，如约1mM至约3mM。

[0127] 在一个实施方案中，本发明提供了pH在约6.0至约8.5，例如约6.5至约8.5范围内的水溶液组合物，其包含：

[0128] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体；

[0129] -选自磷酸盐和三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)的缓冲剂；

[0130] -一种或多种中性氨基酸，例如选自脯氨酸和甘氨酸；和

[0131] -不带电荷的张力调节剂，例如蔗糖；

[0132] 其中缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于组合物中；并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献，组合物的总离子强度小于20mM。

[0133] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约6.0至约8.5,例如约6.5至约8.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0134] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0135] -选自磷酸盐和三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)的缓冲剂;

[0136] -一种或多种中性氨基酸,例如选自脯氨酸和甘氨酸;和

[0137] -不带电荷的张力调节剂,例如蔗糖;

[0138] 其中缓冲剂以约5.5mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM,并且合适地小于10mM。

[0139] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约5.0至约8.0,例如约5.0至约7.5,例如约5.5至约7.5,例如约6.0至约7.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0140] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0141] -选自磷酸盐和柠檬酸盐的缓冲剂;和

[0142] -不带电荷的张力调节剂,例如蔗糖;

[0143] 其中缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。

[0144] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约5.0至约8.0,例如约5.0至约7.5,例如约5.5至约7.5,例如约6.0至约7.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0145] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0146] -选自磷酸盐和柠檬酸盐的缓冲剂;和

[0147] -不带电荷的张力调节剂,例如蔗糖;

[0148] 其中缓冲剂以约5.5mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM,合适地小于10mM。

[0149] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约5.0至约8.0,例如约5.0至约7.5、例如约5.5至约7.5,例如约6.0至约7.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0150] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0151] -选自磷酸盐和柠檬酸盐的缓冲剂;

[0152] -一种或多种中性氨基酸,例如选自脯氨酸和甘氨酸;和

[0153] -不带电荷的张力调节剂,例如蔗糖;

[0154] 其中缓冲剂以约0.1mM至约5mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM。

[0155] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约5.0至约8.0,例如约5.0至约7.5、例如约5.5至约7.5,例如约6.0至约7.5范围内的水溶液组合物,其包含:

[0156] -包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体;

[0157] -选自磷酸盐和柠檬酸盐的缓冲剂;

[0158] -一种或多种中性氨基酸,例如选自脯氨酸和甘氨酸;和

[0159] -不带电荷的张力调节剂,例如蔗糖;

[0160] 其中缓冲剂以约5.5mM至约10mM范围内的总浓度存在于组合物中;并且其中排除工程化蛋白质构建体的贡献,组合物的总离子强度小于20mM,合适地小于10mM。

[0161] 在一个实施方案中,本发明提供了pH在约4.0至约8.5范围内的水溶液组合物,其

包含：

[0162] -包含IgG Fc结构域和两个或更多个免疫球蛋白链可变结构域的工程化蛋白质构建体；

[0163] -一种或多种缓冲剂，所述缓冲剂是具有至少一个 pK_a 在约3.0至约9.5范围内的可电离基团的物质，并且该 pK_a 在组合物的pH的2个pH单位内，并且例如选自柠檬酸盐、组氨酸、马来酸盐、酒石酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、乙酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐和三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)；

[0164] -非离子表面活性剂；

[0165] -不带电荷的张力调节剂，其选自甘油、1,2-丙二醇、甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖、PEG300和PEG400；和

[0166] -任选一种或多种中性氨基酸；

[0167] 其中缓冲剂以约1mM至约10mM的总浓度存在于组合物中；其中排除工程化蛋白质构建体的贡献，组合物的总离子强度小于约20mM(例如小于约10mM)；并且其中组合物的摩尔渗透压浓度为约200mOsm/L至约500mOsm/L，如约350mOsm/L至约500mOsm/L。

[0168] 合适地，本发明的组合物在2-8℃下储存延长的时间段(如至少4周、8周、12周、12个月、18个月或24个月)后保持为澄清溶液。

[0169] 合适地，本发明的组合物在25℃下储存延长的时间段(如至少4周、8周、12周、12个月、18个月或24个月)后保持为澄清溶液。

[0170] 合适地，本发明的组合物在30℃下储存延长的时间段(如至少4周、8周、12周、12个月、18个月或24个月)后保持为澄清溶液。

[0171] 合适地，本发明的组合物在40℃或50℃(即适合于加速稳定性试验的温度)下储存一段时间(如至少1天、3天、1周、2周或4周)后保持为澄清溶液。

[0172] 合适地，与包含更高浓度的一种或多种相同缓冲剂的等同组合物相比，本发明的组合物在2-8℃下或在升高的温度下具有改善的储存稳定性。

[0173] 合适地，与具有更高的总离子强度的等同组合物相比，本发明的组合物在2-8℃下或在升高的温度下具有改善的储存稳定性。

[0174] 在一个实施方案中，在2-8℃下储存至少4周、8周、12周、12个月、18个月或24个月，本发明的组合物包含不超过5%的总杂质，如不超过4%、如不超过3%、如不超过2%的总杂质(按组合物中工程化蛋白质构建体的总重计，如通过阳离子交换色谱、尺寸排阻色谱或类似的合适技术测量的)。

[0175] 在一个实施方案中，本发明的组合物在25℃下储存至少4周、8周、12周、12个月、18个月或24个月，包含不超过5%的总杂质，如不超过4%、如不超过3%、如不超过2%的总杂质(按组合物中工程化蛋白质构建体的总重计，如通过阳离子交换色谱、尺寸排阻色谱或类似的合适技术测量的)。

[0176] 在一个实施方案中，本发明的组合物在30℃下储存至少4周、8周、12周、12个月、18个月或24个月，包含不超过5%的总杂质，如不超过4%、如不超过3%、如不超过2%的总杂质(按组合物中工程化蛋白质构建体的总重计，如通过阳离子交换色谱、尺寸排阻色谱或类似的合适技术测量的)。

[0177] 在一个实施方案中，本发明的组合物在40℃下储存至少1天、3天、1周、2周或4周后

包含不超过5%的总杂质,如不超过4%、如不超过3%、如不超过2%的总杂质(按组合物中工程化蛋白质构建体的总重计,如通过阳离子交换色谱、尺寸排阻色谱或类似的合适技术测量的)。

[0178] 在一个实施方案中,在2-8℃下储存至少4周、8周、12周、12个月、18个月或24个月,与包含相同药物成分的市售组合物相比(如通过阳离子交换色谱、尺寸排阻色谱或类似的合适技术测量的),本发明的组合物包含更低水平的杂质(如通过相同技术测量的)。

[0179] 在一个实施方案中,在25℃下储存至少4周、8周、12周、12个月、18个月或24个月,与包含相同药物成分的市售组合物相比(如通过阳离子交换色谱、尺寸排阻色谱或类似的合适技术测量的),本发明的组合物包含更低水平的杂质(如通过相同技术测量的)。

[0180] 在一个实施方案中,在30℃下储存至少4周、8周、12周、12个月、18个月或24个月,与包含相同药物成分的市售组合物相比(如通过阳离子交换色谱、尺寸排阻色谱或类似的合适技术测量的),本发明的组合物包含更低水平的杂质(如通过相同技术测量的)。

[0181] 在一个实施方案中,在40℃或50℃下储存至少1天、3天、1周、2周或4周后,与包含相同药物成分的市售组合物相比(如通过阳离子交换色谱、尺寸排阻色谱或类似的合适技术测量的),本发明的组合物包含更低水平的杂质(如通过相同技术测量的)。

[0182] 在一个实施方案中,本发明的组合物是用于治疗的组合物。在一个实施方案中,本发明的组合物是药物组合物。组合物,例如旨在用于静脉内施用的那些,可以制备为浓缩物,用于在施用前稀释。

[0183] 上述关于水溶液组合物的所有实施方案同样适用于本发明的方法和用途。

[0184] 还提供了例如由塑料或玻璃制成的容器,其含有一个剂量或多个剂量的如本文所述的组合物。容器可以是例如小瓶、预填充注射器、预填充输液袋或设计成与注射装置一起使用的可更换物品的药筒。

[0185] 本发明的组合物可以适当地包装用于注射,尤其是静脉内输注、静脉内注射、皮下注射或肌肉注射。

[0186] 本发明的一个方面是用于单次或多次使用的注射或输注装置,特别是适于皮下或肌肉注射或输注的装置,其包含含有一个剂量或多个剂量的本发明组合物的容器以及注射针。在一个实施方案中,容器是包含多个剂量的可更换药筒。在一个实施方案中,注射装置是笔的形式。在一个实施方案中,注射装置为预填充注射器的形式。在一个实施方案中,注射或输注装置是泵或另一种可穿戴注射或输注装置的形式。

[0187] 预期根据本发明的组合物具有如本文所述的良好物理和化学稳定性。

实施例

[0188] 一般方法

[0189] 评估蛋白质构建体的稳定性的方法(a)目测评估

[0190] 使用2.9.20欧洲药典专论(微粒污染:可见微粒)适当地检测可见颗粒。所需的设备包括观察站,该观察站包括:

- [0191] • 保持在垂直位置的适当尺寸的哑光黑色面板
- [0192] • 适当尺寸的非眩光白色面板,其保持在黑色面板旁边的垂直位置
- [0193] • 可调节灯座,其配备有合适的阴影白光源和合适的光漫射器(包含两个13W荧光

灯管的观察照明器,每个长度为525nm是合适的)。观察点处的照明强度保持在2000lux和3750lux之间。

[0194] 从容器中除去任何粘附的标签,并洗涤外部并干燥。将容器轻轻涡旋或倒置,确保不引入气泡,并在白色面板前方观察约5s。在黑色面板前面重复该过程。记录任何颗粒的存在。

[0195] 目测评分排序如下:

[0196] 目测评分A:澄清溶液,几乎不含颗粒,<10个颗粒

[0197] 目测评分B:仅在灯下可见的颗粒

[0198] 目测评分C:在正常实验室条件下外观的显著可见变化。虽然具有目测评分C的样品中的颗粒在正常光下的随意目测评估中可清楚地检测到,但具有目测评分A和B的样品在相同的评估中通常表现为澄清溶液。具有目测评分A和B的样品被认为是“合格的”;具有目测评分C的样品被认为是“失败”。(b) 尺寸排阻色谱 (SEC)

[0199] 使用具有保护柱的300×7.8mm TSK Gel G3000 SWXL(或等同物)尺寸排阻柱测量高分子量物质的量。流动相是磷酸钠缓冲液pH 6.75,流速为1ml/min,注入体积为20μl,并在280nm处检测。结果表示为%高分子物质(HMWS),即对应于聚集蛋白质的所有峰面积的总和相对于色谱图上的所有蛋白质相关峰的总和。可以在%面积(单体、HMWS和低分子物质(LMWS))的绝对值方面观察到小的时间点与时间点的变异性,例如由于重复的尺寸排阻柱使用引起的。然而,在给定的时间点内,在相同条件下使用柱测试样品,因此在时间点内产生的值代表蛋白质在测试的水溶液中的相对稳定性的非常好的指标。%HMWS的增加意指在给定的时间点观察到的%HMWS与时间零时(即在储存温度下孵育之前即刻)的%HMWS值相比的变化。

[0200] (c) 阳离子交换色谱 (CEX)

[0201] 使用Protein-Pak Hi Res SP柱测量相关物质的量。流动相A是20mM磷酸钠(pH 6.5);流动相B是20mM磷酸钠+0.5M NaCl(pH 6.0)。使用以下梯度洗脱:0分钟-100%A,4min-80%A,10min-55%A,12min-0%A。流速1.0ml/min;注入体积为3μl,UV检测在214nm。结果表示为%主峰(即天然蛋白质)、%酸性物质和%碱性物质。%相关物质=%酸性物质+%碱性物质。

[0202] 实施例1-实施例制剂

[0203] 可以制备以下实施例制剂:

[0204] 实施例A:

Fc-融合蛋白* 50mg/mL

磷酸钠 1mM

[0205] 蔗糖 300mM

注射用水 qs

[0206] 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例B:

	Fc-融合蛋白*	50mg/L
[0207]	乙酸钠	3mM
	蔗糖	300mM
	注射用水	qs
[0208]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至5.0实施例C:	
	Fc-融合蛋白*	50mg/mL
	乙酸钠	3mM
[0209]	蔗糖	300mM
	脯氨酸	100mM
	注射用水	qs
[0210]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至5.0实施例D:	
	Fc-融合蛋白*	50mg/mL
	磷酸钠	3mM
[0211]	蔗糖	300mM
	注射用水	qs
[0212]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例E:	
	Fc 融合蛋白*	50mg/mL
	TRIS	1mM
[0213]	蔗糖	300mM
	注射用水	qs
[0214]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例F:	
	Fc-融合蛋白*	50mg/mL
	TRIS	3mM
[0215]	蔗糖	300mM
	注射用水	qs
[0216]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例G:	

- | | | |
|--------|-------------------------|---------|
| | Fc-融合蛋白* | 50mg/L |
| [0217] | TRIS | 3mM |
| | 蔗糖 | 500mM |
| | 注射用水 | qs |
| [0218] | 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例H: | |
| | Fc-融合蛋白* | 50mg/mL |
| | 磷酸钠 | 1mM |
| [0219] | 蔗糖 | 300mM |
| | 脯氨酸 | 100mM |
| | 注射用水 | qs |
| [0220] | 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例I: | |
| | Fc-融合蛋白* | 50mg/mL |
| | TRIS | 1mM |
| [0221] | 蔗糖 | 300mM |
| | 脯氨酸 | 100mM |
| | 注射用水 | qs |
| [0222] | 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例J: | |
| | Fc 融合蛋白* | 50mg/mL |
| | 磷酸钠 | 1mM |
| [0223] | 蔗糖 | 300mM |
| | 甘氨酸 | 100mM |
| | 注射用水 | qs |
| [0224] | 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例K: | |
| | Fc-融合蛋白* | 50mg/mL |
| | 磷酸钠 | 1mM |
| [0225] | 蔗糖 | 400mM |
| | 甘氨酸 | 150mM |
| | 注射用水 | qs |
| [0226] | 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例L | |

	Fc-融合蛋白*	50mg/mL
	TRIS	1mM
[0227]	蔗糖	300mM
	甘氨酸	100mM
	注射用水	qs
[0228]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例M:	
[0229]	Fc-融合蛋白*	50mg/mL
	磷酸钠	7mM
[0230]	蔗糖	300mM
	注射用水	qs
[0231]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例N:	
	Fc-融合蛋白*	50mg/mL
	乙酸钠	7mM
[0232]	蔗糖	300mM
	脯氨酸	100mM
	注射用水	qs
[0233]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至5.0实施例O:	
	Fc-融合蛋白*	50mg/mL
	磷酸钠	7mM
[0234]	蔗糖	300mM
	注射用水	qs
[0235]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例P:	
	Fc-融合蛋白*	50mg/mL
	磷酸钠	7mM
[0236]	蔗糖	300mM
	脯氨酸	100mM
	注射用水	qs
[0237]	使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例Q:	

- | | | |
|--------|---|---------|
| | Fc-融合蛋白* | 50mg/mL |
| [0238] | 磷酸钠 | 9mM |
| | 蔗糖 | 300mM |
| | 注射用水 | qs |
| [0239] | 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例R: | |
| | Fc-融合蛋白* | 50mg/mL |
| | 乙酸钠 | 9mM |
| [0240] | 蔗糖 | 300mM |
| | 脯氨酸 | 100mM |
| | 注射用水 | qs |
| [0241] | 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至5.0实施例S: | |
| | Fc-融合蛋白* | 50mg/mL |
| | 磷酸钠 | 9mM |
| [0242] | 蔗糖 | 300mM |
| | 注射用水 | qs |
| [0243] | 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0实施例T: | |
| | Fc-融合蛋白* | 50mg/mL |
| | 磷酸钠 | 9mM |
| [0244] | 蔗糖 | 300mM |
| | 脯氨酸 | 100mM |
| | 注射用水 | 适量 |
| [0245] | 使用盐酸或氢氧化钠将pH调节至7.0 | |
| [0246] | *Fc-融合蛋白是(1)依那西普、(2)阿柏西普或(3)度拉糖肽。 | |
| [0247] | 实施例AA-TT: | |
| [0248] | 制备与实施例A-T相同的制剂,不同之处使用包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体,其是双特异性抗体而不是Fc融合蛋白。 | |
| [0249] | 实施例AAA-TTT: | |
| [0250] | 制备与实施例A-T相同的制剂,不同之处在于使用包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体,其是三特异性抗体而不是Fc融合蛋白。 | |
| [0251] | 在40℃下孵育2、4和8周后,使用目测评估、SEC和CEX(参见一般方法)确定制剂的稳定性。 | |
| [0252] | 在25℃下孵育2、4、8和12周后,使用目测评估、SEC和CEX(参见一般方法)确定制剂 | |

的稳定性。

[0253] 在2-8℃下孵育2、4、8和12周后,使用目测评估、SEC和CEX(参见一般方法)确定制剂的稳定性。

[0254] 实施例2-缓冲剂浓度和张力调节剂的电荷对度拉糖肽在40℃和50℃下稳定性的影响

[0255] 研究了缓冲剂浓度和张力调节剂的电荷对度拉糖肽(1mg/mL)稳定性的影响。测试柠檬酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。将氯化钠(150mM)用作带电荷的张力调节剂,蔗糖(250mM)用作不带电荷的张力调节剂。将所有测试的制剂调节至pH 6.5。此外,市售度拉糖肽产品(Trulicity)的制剂用作对照制剂用于比较。表1总结了测试的制剂。所有制剂在40℃和50℃下应激4周。通过使用SEC监测高分子量物质形成的速率来跟踪度拉糖肽的稳定性。

[0256] 表1:测试的度拉糖肽制剂。所有制剂均含有度拉糖肽(1mg/mL)并调节至pH 6.5。

[0257]

制剂	柠檬酸 (mM)	磷酸钠 (mM)	氯化钠 (mM)	蔗糖 (mM)	甘露糖醇 (mM)	Tween 80 (mg/ml)
2-1	1	-	150	-	-	-
2-2	5	-	150	-	-	-
2-3	10	-	150	-	-	-
2-4	50	-	150	-	-	-
2-5	1	-	-	250	-	-
2-6	3	-	-	250	-	-
2-7	5	-	-	250	-	-
2-8	7	-	-	250	-	-
2-9	10	-	-	250	-	-
2-10	50	-	-	250	-	-
2-11	-	1	150	-	-	-
2-12	-	5	150	-	-	-
2-13	-	10	150	-	-	-
2-14	-	50	150	-	-	-
2-15	-	1	-	250	-	-
2-16	-	3	-	250	-	-
2-17	-	5	-	250	-	-
2-18	-	7	-	250	-	-
2-19	-	10	-	250	-	-
2-20	-	50	-	250	-	-
2-21 (对照 制剂)	10*	-	-	-	250	0.067

[0258] *通过将柠檬酸钠(9.3mM)与柠檬酸(0.7mM)混合制备

[0259] 在两种温度下储存后,所有测试的制剂均通过了目测测试(目测评分A)。在50℃和40℃下储存后,制剂2-1至2-21中的HMWS形成速率示于表2中。在包含非常低的缓冲剂浓度和不带电荷的张力调节剂的制剂中,HMWS形成速率最低。在蔗糖存在下,在40℃下在包含高达5mM柠檬酸盐缓冲剂的组合物中未观察到可检测的HMWS增加。HMWS形成速率在较高浓度的柠檬酸盐缓冲剂下增加。类似地,在50℃下更加速的应力下,HMWS形成的速率与柠檬酸盐缓冲剂的浓度成比例,在5mM或更低的缓冲剂浓度下非常低。使用磷酸盐缓冲剂进行类似的观察。相反,在所有缓冲剂浓度下,在氯化钠存在下观察到HMWS形成。

[0260] 表2:通过SEC评估的制剂2-1至2-21中的度拉糖肽(1mg/ml)在40℃和50℃下的稳定性。

[0261]

制剂	在所示温度下孵育后%HMWS 的增加	
	50 °C (4 周)	40 °C (4 周)
2-1	7.97	0.80
2-2	6.73	0.68
2-3	8.33	1.03
2-4	11.18	1.33
2-5	0.06	0
2-6	0.05	0
2-7	2.17	0
2.8	2.66	0
2-9	5.2	0.41
2-10	11.92	1.74
2-11	8.9	0.64
2-12	12.01	0.60

制剂	在所示温度下孵育后%HMWS 的增加	
	50 °C (4 周)	40 °C (4 周)
2-13	6.86	0.68
2-14	10.81	0.90
2-15	不可获得*	不可获得*
[0262] 2-16	0.77	0
2-17	3.26	0
2-18	3.71	0.07
2-19	4.56	0.23
2-20	17.44	1.74
2-21 (对照制剂)	4.24	0.32

[0263] *遗憾的是,该制剂的测试由于与制剂本身无关的原因而失败

[0264] 实施例3-缓冲剂浓度和张剂调节剂的电荷对阿巴西普在50°C下稳定性的影响

[0265] 研究了缓冲剂浓度和张剂调节剂的电荷对阿巴西普 (4.25mg/mL) 稳定性的影响。测试柠檬酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。将氯化钠 (150mM) 用作带电荷的张剂调节剂,蔗糖 (250mM) 用作不带电荷的张剂调节剂。将所有测试的制剂调节至pH6.8。此外,将市售的阿巴西普产品 (Orencia) 的制剂用作对照制剂用于比较。表3总结了测试的制剂。所有制剂在50 °C下应激2周。通过使用SEC监测高分子量物质形成的速率来跟踪阿巴西普的稳定性。

[0266] 表3: 测试的阿巴西普制剂。所有制剂均含有阿巴西普 (4.25mg/mL) 并调节至 pH6.8。

制剂	柠檬酸 (mM)	磷酸钠 (mM)	氯化钠 (mM)	蔗糖 (mM)	麦芽糖 (mM)
[0267] 3-1	1	-	150	-	-
3-2	5	-	150	-	-
3-3	10	-	150	-	-

[0268]

制剂	柠檬酸 (mM)	磷酸钠 (mM)	氯化钠 (mM)	蔗糖 (mM)	麦芽糖 (mM)
3-4	50	-	150	-	-
3-5	1	-	-	250	-
3-6	3	-	-	250	-
3-7	5	-	-	250	-
3-8	10	-	-	250	-
3-9	50	-	-	250	-
3-10	-	1	150	-	-
3-11	-	5	150	-	-
3-12	-	10	150	-	-
3-13	-	50	150	-	-
3-14	-	1	0	250	-
3-15	-	3	0	250	-
3-16	-	5	0	250	-
3-17	-	10	0	250	-
3-18	-	50	0	250	-
3-19 (对照制剂)	-	12.5	25	-	138.8

[0269] 在50℃下储存后,所有测试的制剂均通过了目测测试(目测评分A)。在50℃下储存后,制剂3-1至3-19中HMWS形成的速率示于表4中。在包含非常低的缓冲剂浓度和不带电荷的张力调节剂的制剂中,HMWS形成速率最低。在柠檬酸盐和磷酸盐缓冲剂的情况下,HMWS形成速率随着缓冲剂浓度的增加而增加。相反,无论缓冲剂浓度如何,在氯化钠存在下HMWS形成非常高。

[0270] 表4:通过SEC评估的制剂3-1至3-19中阿巴西普(4.25mg/mL)在50℃下的稳定性。

[0271]

制剂	在 50℃ 下孵育 2 周后%HMWS 的增加
----	-------------------------

[0272]

制剂	在 50°C 下孵育 2 周后%HMWS 的增加
3-1	84.33
3-2	85
3-3	83.39
3-4	85.49
3-5	19.35
3-6	22.92
3-7	34.84
3-8	54.39
3-9	76.36
3-10	83.8
3-11	82.56
3-12	82.78
3-13	83.96
3-14	24.81
3-15	31.36
3-16	38.80
3-17	48.20
3-18	72.71
3-19 (对照制剂)	70.58

[0273] 实施例4-缓冲剂浓度和张剂调节剂的电荷对阿巴西普在40°C下稳定性的影响

[0274] 研究了柠檬酸盐缓冲剂浓度和张剂调节剂的电荷对阿巴西普(4.25mg/mL)稳定性的影响。将氯化钠(150mM)用作带电荷的张剂调节剂,蔗糖(250mM)用作不带电荷的张剂调节剂。将所有测试的制剂调节至pH 6.8。表5总结了测试的制剂。所有制剂在40°C下应激2周。通过使用SEC监测高分子量物质形成的速率来追踪阿巴西普的稳定性。

[0275] 表5:测试的阿巴西普制剂。所有制剂均含有阿巴西普(4.25mg/mL)并调节至pH 6.8。

制剂	柠檬酸 (mM)	磷酸钠 (mM)	氯化钠 (mM)	蔗糖 (mM)	麦芽糖 (mM)
4-1	1		150	-	
4-2	5		150	-	
4-3	10		150	-	
[0276] 4-4	50		150	-	
4-5	1		-	250	
4-6	3		-	250	
4-7	5		-	250	
4-8	10		-	250	
4-9	50		-	250	

[0277] 在40℃下储存后,所有测试的制剂均通过了目测测试(目测评分A)。在40℃下储存后,制剂4-1至4-9中HMWS形成的速率示于表6中。在包含非常低的柠檬酸盐缓冲剂浓度和不带电荷的张力调节剂的组合物中,HMWS形成速率最低。HMWS的形成速率随柠檬酸盐缓冲剂浓度增加而增加。相反,无论缓冲剂浓度如何,在氯化钠存在下HMWS形成非常高。

[0278] 表6:通过SEC评估的制剂4-1至4-9中阿巴西普(4.25mg/mL)在40℃下的稳定性。

制剂	在 40℃ 下孵育 2 周后%HMWS 的增加
4-1	16.55
[0279] 4-2	17.69
4-3	17.21
4-4	19.64
4-5	2.61
4-6	3.03
[0280] 4-7	3.80
4-8	4.72
4-9	7.42

[0281] 实施例5-在1mM缓冲剂和不带电荷的张力调节剂存在下,脯氨酸对50℃下阿巴西普稳定性的影响

[0282] 在1mM缓冲剂和不带电荷的张力调节剂存在下,研究脯氨酸(50mM)对阿巴西普

(4.25mg/mL)稳定性的影响。将蔗糖(250mM)用作不带电荷的张力调节剂。将所有测试的制剂调节至pH 6.8。表7总结了测试的制剂。所有制剂在50℃下应激2周。通过使用SEC监测高分子量物质形成的速率来追踪阿巴西普的稳定性。

[0283] 表7: 测试的阿巴西普制剂。所有制剂均含有阿巴西普(4.25mg/mL)并调节至pH6.8。

[0284]

制剂	柠檬酸(mM)	磷酸钠(mM)	蔗糖(mM)	脯氨酸(mM)
5-1	1	-	250	-
5-2	1	-	250	50
5-3	-	1	250	-
5-4	-	1	250	50

[0285] 在50℃下储存后,所有测试的制剂均通过了目测测试(目测评分A)。在50℃下储存后,制剂5-1至5-4中HMWS形成的速率示于表8中。在包含1mM缓冲剂和蔗糖(250mM)的组合物中脯氨酸(50mM)的存在导致较低的HMWS形成速率。

[0286] 表8: 通过SEC评估的制剂5-1至5-4中阿巴西普(4.25mg/mL)在50℃下的稳定性。

[0287]

制剂	在50℃下孵育2周后%HMWS的增加
5-1	19.35
5-2	17.43
5-3	24.81
5-4	22.58

[0288] 实施例6- 在1mM缓冲剂和不带电荷的张力调节剂存在下,脯氨酸和甘氨酸对40℃下阿巴西普稳定性的影响

[0289] 在1mM缓冲剂和不带电荷的张力调节剂存在下,研究脯氨酸(50mM)和甘氨酸(50mM)对阿巴西普(4.25mg/mL)稳定性的影响。测试柠檬酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。将蔗糖(250mM)用作不带电荷的张力调节剂。将所有测试的制剂调节至pH6.8。表9总结了测试的制剂。所有制剂在40℃下应激2周。通过使用SEC监测高分子量物质形成的速率来追踪阿巴西普的稳定性。

[0290] 表9: 测试的阿巴西普制剂。所有制剂均含有阿巴西普(4.25mg/mL)并调节至pH6.8。

[0291]

制剂	柠檬酸(mM)	磷酸钠(mM)	蔗糖(mM)	脯氨酸(mM)	甘氨酸(mM)
6-1	1	-	250	-	-
6-2	1	-	250	50	-
6-3	1	-	250	-	50
6-4	-	1	250	-	-
6-5	-	1	250	50	-
6-6	-	1	250	-	50

[0292] 在40℃下储存后,所有测试的制剂均通过了目测测试(目测评分A)。在40℃下储存后,制剂6-1至6-6中HMWS形成的速率示于表10中。在包含1mM缓冲剂和蔗糖(250mM)的组合物中脯氨酸(50mM)和甘氨酸(50mM)的存在导致较低的HMWS形成速率。

[0293] 表10:通过SEC评估的制剂6-1至6-6中阿巴西普(4.25mg/mL)在40℃下的稳定性。

[0294]	制剂	在40℃下孵育2周后%HMWS的增加
	6-1	2.61
	6-2	1.64
	6-3	1.81
	6-4	5.37
	6-5	3.69
	6-6	4.82

[0295] 实施例7-缓冲剂浓度、张力调节剂和中性氨基酸对阿巴西普在40℃下在低离子强度组合物中的稳定性的影响

[0296] 研究了缓冲剂浓度、张力调节剂和中性氨基酸对40℃下阿巴西普稳定性的影响。将柠檬酸用作缓冲剂。蔗糖和1,2-丙二醇作为张力调节剂进行测试,脯氨酸作为中性氨基酸进行测试。将所有测试的制剂调节至pH6.8。表11总结了测试的制剂。所有制剂在40℃下应激2周和4周。通过使用SEC监测高分子量物质形成的速率来追踪阿巴西普的稳定性。

[0297] 表11:测试的阿巴西普制剂。所有制剂均含有阿巴西普(4.25mg/mL)并调节至pH6.8。

	制剂	柠檬酸(mM)	蔗糖(mM)	1,2-丙二醇(mM)	脯氨酸(mM)
	7-1	1	300	-	-
[0298]	7-2	3	300	-	-
	7-3	5	300	-	-
	7-4	7	300	-	-

[0299]

制剂	柠檬酸 (mM)	蔗糖 (mM)	1,2-丙二醇 (mM)	脯氨酸 (mM)
7-5	10	300	-	-
7-6	20	300	-	-
7-7	1	-	300	-
7-8	3	-	300	-
7-9	5	-	300	-
7-10	7	-	300	-
7-11	10	-	300	-
7-12	20	-	300	-
7-13	1	150	-	150
7-14	3	150	-	150
7-15	5	150	-	150
7-16	7	150	-	150
7-17	10	150	-	150
7-18	20	150	-	150

[0300] 在40℃下储存2周和4周后,所有测试的制剂均通过了目测测试(目测评分A)。在40℃下储存后,制剂7-1至7-18中HMWS形成的速率示于表12中。显示HMWS形成速率随着柠檬酸浓度的增加而增加,特别是在10mM或更高的浓度下。使用1,2-丙二醇作为不带电荷的张力调节剂代替蔗糖,显示HMWS形成速率仅略微更高。向含有蔗糖的制剂中添加中性氨基酸(脯氨酸)提供了最低的HMWS形成速率,即使当蔗糖的浓度降低至150mM时也是如此。

[0301] 表12:通过SEC评估的制剂7-1至7-18中阿巴西普(4.25mg/mL)在40℃下的稳定性,并调节至pH6.8。

[0302]

制剂	在 40℃下孵育 2 周后%HMWS 的增加	在 40℃下孵育 4 周后%HMWS 的增加
----	------------------------	------------------------

[0303]

制剂	在 40°C下孵育 2 周后%HMWS 的增加	在 40°C下孵育 4 周后%HMWS 的增加
7-1	2.54	5.00
7-2	2.99	5.93
7-3	3.55	7.03
7-4	4.12	8.23
7-5	4.89	9.99
7-6	6.01	12.87
7-7	2.71	5.36
7-8	3.04	5.99
7-9	3.67	7.30
7-10	4.24	8.56
7-11	5.67	12.12
7-12	7.30	17.44
7-13	1.39	2.49
7-14	1.98	3.75
7-15	2.46	4.58
7-16	3.13	6.05
7-17	4.09	8.88
7-18	5.88	11.84

[0304] 比较例8-缓冲剂浓度、张力调节剂的电荷和中性氨基酸对30°C下免疫球蛋白G1 (IgG1) 稳定性的影响

[0305] 研究了缓冲剂浓度和张力调节剂的电荷对IgG1 (100mg/ml) 稳定性的影响。测试了柠檬酸盐缓冲剂。氯化钠 (150mM) 用作带电荷的张力调节剂, 甘油 (300mM) 用作不带电荷的张力调节剂。还在1mM缓冲剂和两种张力调节剂的存在下研究了脯氨酸和甘氨酸 (50mM) 对IgG1稳定性的影响。所有测试的制剂含有聚山梨醇酯80 (0.2mg/mL) 并调节至pH6.0。表13总结了测试的制剂。所有制剂在30°C下应激8周。通过使用SEC监测高分子量物质形成的速率来追踪IgG1的稳定性。

[0306] 表13: 测试的IgG1的制剂。所有制剂含有IgG1 (100mg/mL) 和聚山梨醇酯80 (0.2mg/mL) 并调节至pH 6.0。

[0307]

制剂	柠檬酸 (mM)	氯化钠 (mM)	甘油 (mM)	脯氨酸 (mM)	甘氨酸 (mM)	离子强度
8-1	1	150	-	-	-	153.8
8-2	5	150	-	-	-	168.7
8-3	20	150	-	-	-	224.8
8-4	1	-	300	-	-	3.8
8-5	5	-	300	-	-	18.7
8-6	20	-	300	-	-	74.8
8-7	1	-	300	50	-	3.8
8-8	1	-	300	-	50	3.8

[0308] 在30℃下储存后,所有测试的制剂均通过了目测测试(目测评分A)。在30℃下储存后,制剂8-1至8-8中HMWS形成的速率示于表14中。在氯化钠存在下和在甘油存在下,HMWS形成的速率随着缓冲剂浓度的增加而降低(比较制剂8-1至8-3,并比较制剂8-4至8-6)。柠檬酸浓度低(1或5mM)时,在制剂的较高离子强度下存在稳定性较高的轻微趋势(将制剂8-1与制剂8-4进行比较,并将制剂8-2与制剂8-5进行比较)。柠檬酸浓度高(20mM)(比较制剂8-3与制剂8-6)时,该规律相反,尽管在这种情况下,两种制剂的离子强度均高于70mM。中性氨基酸(脯氨酸或甘氨酸)的存在导致HMWS形成速率的非常轻微的增加。

[0309] 表14:通过SEC评估的制剂8-1至8-8中IgG1(100mg/mL)在30℃下的稳定性。

[0310]

制剂	在30℃下孵育8周后%HMWS的增加
8-1	6.28
8-2	5.15
8-3	4.41
8-4	6.58
8-5	5.48
8-6	4.27
8-7	6.67
8-8	6.68

[0311] 实施例小结

[0312] 实施例2-7的数据显示含有至多5mM和低离子强度(如小于20mM,不包括工程化蛋白质构建体的贡献)的缓冲剂时,含有Fc结构域的工程化蛋白质构建体的制剂是稳定的。较高的缓冲剂浓度,特别是高于10mM,和较高的离子强度,特别是高于20mM(不包括工程化蛋白质构建体的贡献)是不稳定的。中性氨基酸的存在得到进一步的稳定。令人惊讶的是,这与测试的4链抗体(IgG1型)表现出的行为相反。比较例8的数据显示该抗体在较高的缓冲剂浓度和较高的离子强度下更稳定。中性氨基酸的存在进一步不稳定。

[0313] 不受理论限制,发明人认为与天然蛋白质或基于天然结构模板的重组蛋白质(例

如免疫球蛋白)相比,包含Fc结构域的新型工程化蛋白质构建体的表达导致蛋白质表面处更丰富的疏水性小片以及更大程度地暴露不定位点,如易于水解切割的区域。这又导致更大的聚集和结构降解倾向。不受理论限制,本发明组合了认为协同作用的制剂特征,以筛选非天然疏水性小片以及使非天然暴露的不定位点处的质子交换速率最小化,导致包含Fc结构域的工程化蛋白质构建体的实质性稳定性改善。

[0314] 在整个说明书和随后的权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括(comprise)”以及诸如“包含(comprises)”和“含有(comprising)”的变体将被理解为暗示包括所述整数、步骤、整数组或步骤组,但不排除任何其他整数、步骤、整数组或步骤组。

[0315] 在本发明的整个说明书中提及的所有专利、专利申请和参考文献通过引用整体并入本文。

[0316] 本发明包括优选的和更优选的组以及合适的和更合适的组和上述组的实施方案的所有组合。