

1. 制剂,其包含:

包含由SEQ ID NO: 10的氨基酸序列组成的重链氨基酸序列和由SEQ ID NO: 11的氨基酸序列组成的轻链氨基酸序列的抗CD3抗体、10 mM至500 mM的三水乙酸钠、10 mM至500 mM的氯化钠、0.01%至1% (w/v)的聚山梨酯80。

2. 权利要求1的口服制剂,其包含单位剂量的抗CD3抗体或抗原结合片段,其中所述单位剂量为0.1 mg至10 mg。

3. 权利要求1或2的制剂,其中所述制剂处于的pH范围为4-6。

4. 权利要求1-3中任一项的制剂,其中所述三水乙酸钠的浓度为25 mM至250 mM。

5. 权利要求1-4中任一项的制剂,其中所述氯化钠的浓度为125 mM。

6. 权利要求1-5中任一项的制剂,其中所述聚山梨酯80的浓度为0.2 mg/mL。

7. 权利要求1-6中任一项的制剂,其中所述制剂是经鼻制剂。

8. 权利要求1-7中任一项的制剂,其中所述制剂是气溶胶。

9. 权利要求1-8中任一项的制剂在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或减轻自身免疫病、炎性疾病或神经退行性疾病的症状的方法中。

抗CD3抗体制剂

[0001] 本申请是申请日为2017年8月29日的中国专利申请201780052970.8“抗CD3抗体制剂”的分案申请。

[0002] 相关申请

本申请要求2016年8月29日提交的U.S.S.N. 62/380,652的权益及优先权;该申请的内容以其整体通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及抗CD3抗体的制剂、剂量和给药方案以及其使用方法。

背景技术

[0004] 已证明针对T细胞受体复合物的CD3 ϵ 信号传导分子的抗体可用作免疫抑制剂和用于治疗自身免疫病。因此,制备抗CD3抗体的改进方法、纯化抗CD3抗体的方法和含有抗CD3抗体的药物制剂将是有益的。

发明内容

[0005] 本公开提供了特异性针对CD3的单克隆抗体的制剂、剂量和给药方案。本公开的制剂包括抗CD3抗体,并且这些制剂在本文中称为“抗CD3抗体制剂”。在一些实施方案中,抗CD3抗体制剂是口服制剂。

[0006] 在各个方面,本发明提供了包含抗CD3抗体或其抗原结合片段、三水乙酸钠、氯化钠、聚山梨酯80、海藻糖和甲硫氨酸的制剂。任选地,制剂还包含EDTA。制剂是液体或冻干粉末。制剂包含单位剂量的抗CD3抗体或抗原结合片段。单位剂量为例如约0.1mg至10mg。优选地,单位剂量为0.5mg、2.5mg或5.0mg。

[0007] 当制剂是液体时,三水乙酸钠的浓度为约10mM至500mM;氯化钠的浓度为约10mM至500mM;聚山梨酯80的浓度为约0.01%至1% (w/v);海藻糖的浓度为约5%至50% (w/v);并且甲硫氨酸的浓度为约0.01%至1% (w/v)。当包含EDTA时,EDTA的浓度为约0.01%至1% (w/v)。溶液的pH在pH 4至pH 6的范围内。在各个方面,制剂为口服剂型,例如胶囊。胶囊是肠溶包衣的。本发明还包括液体制剂的冻干粉末。

[0008] 在另一方面,本发明提供液体制剂,其具有单位剂量的约0.1mg至10mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段、25mM三水乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v) 和0.1%甲硫氨酸 (w/v)。任选地,制剂还包含0.1%EDTA (w/v)。单位剂量为0.5mg、2.5mg或5.0mg。溶液的pH在pH 4至pH 6的范围内。在各个方面,制剂为口服剂型,例如胶囊。胶囊是肠溶包衣的。本发明还包括液体制剂的冻干粉末。

[0009] 当制剂是冻干粉末时,抗CD3抗体或抗原结合片段与聚山梨酯80的比例为约1:0.01至0.1 (w/w);抗CD3抗体或抗原结合片段与海藻糖的比例为约1:10至50 (w/w);抗CD3抗体或抗原结合片段与甲硫氨酸的比例为约1:0.1至0.5 (w/w);抗CD3抗体或抗原结合片段与三水乙酸钠的比例为约1:0.1至1.0 (w/w);且抗CD3抗体或抗原结合片段与氯化钠的

比例约为1:0.5至2.0 (w/w)。当包括EDTA时,抗CD3抗体或抗原结合片段与EDTA的比例为约1:0.1至0.5 (w/w)。在各个方面,制剂为口服剂型,例如胶囊。胶囊是肠溶包衣的。

[0010] 在另一方面,本发明提供粉末制剂,其具有单位剂量的约0.1mg至10mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸钠、1.25mg氯化钠、0.034mg聚山梨酯80、34mg海藻糖和0.17mg甲硫氨酸。任选地,粉末制剂还包含每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段0.17mg EDTA。单位剂量为0.5mg、2.5mg或5.0mg。

[0011] 本发明还包括含有任何本发明制剂的肠溶包衣的口服胶囊。

[0012] 在另一方面,本发明提供含有抗CD3抗体冻干制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗CD3抗体冻干制剂具有单位剂量的约0.1mg至10mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸钠、1.25mg氯化钠、0.034mg聚山梨酯80、34mg海藻糖和0.17mg甲硫氨酸。任选地,抗CD3抗体冻干制剂还包含每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段0.17mg EDTA。单位剂量为0.5mg、2.5mg或5.0mg。

[0013] 在又另一方面,本发明提供含有抗CD3抗体液体制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗CD3抗体液体制剂具有单位剂量的约0.1mg至10mg抗CD3抗体或其抗原结合片段、25mM三水乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)和0.1%甲硫氨酸 (w/v)。任选地,抗CD3抗体液体制剂还包含0.1% EDTA。单位剂量为0.5mg、2.5mg或5.0mg。

[0014] 根据本发明的制剂的抗CD3抗体-CD3抗体具有例如:包含氨基酸序列GYGMH (SEQ ID NO: 1)的重链互补决定区1(CDRH1)、包含氨基酸序列VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 3)的重链互补决定区2(CDRH2)、包含氨基酸序列QMGYWDFDL (SEQ ID NO: 4)的重链互补决定区3(CDRH3)、包含氨基酸序列RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 5)的轻链互补决定区1(CDRL1)、包含氨基酸序列DASNRAT (SEQ ID NO: 6)的轻链互补决定区2(CDRL2)和包含氨基酸序列QQRSNPPLT (SEQ ID NO: 7)的轻链互补决定区3(CDRL3)。

[0015] 可选地,-CD3抗体具有包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的可变重链氨基酸序列和包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的可变轻链氨基酸序列。在其他方面,抗-CD3抗体具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链氨基酸序列和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链氨基酸序列。

[0016] 在各个方面,本发明的制剂具有至少一种另外的活性剂。另外的活性剂包括例如NF- κ B抑制剂、GLP-1或 β 细胞静息化合物、美沙拉嗪或另一种5-ASA药物、己酮可可碱、熊去氧胆酸、PPAR γ 激动剂、全反式维甲酸(ATRA)、DPP-4(格列汀类-西他列汀)、脂肪酸合成抑制剂(如浅蓝菌素、槲皮素、C7、芹菜素、AICAR)、FXR激动剂(如胆汁盐活化剂、鹅去氧胆酸、奥贝胆酸(OIBA、Ocaliva)、fexaramine、咖啡醇、胆汁酸螯合剂(消胆胺、降胆宁、coleserelam)、SGLT2抑制剂(前达格列净(ex-dapagliflozin)(降低HbA1c水平)、抗IL-6RmAb、抗TNF抗体(Remicade®(英利昔单抗)和Humira®(阿达木单抗)、Enbrel®(依那西普)抗炎和/或免疫抑制化合物(如甲氨蝶呤、环孢菌素A环孢菌素微乳)、他克莫司、皮质类固醇、他汀类药物、干扰素 β 、醋酸格拉替雷(Copaxone)、干扰素 β -1a(Avonex)、干扰素 β -1a(Rebif)、干扰素 β -1b(Betaseron或Betaferon)、米托蒽醌(Novantrone)、地塞米松(Decadron)、甲基强的松龙(Depo-Medrol)、强的松(Deltasone)或抗肥胖药物。

[0017] 本发明进一步提供了通过向其需要的主体施用根据本发明的制剂来治疗或减轻自身免疫病、炎性疾病、神经退行性疾病或癌症的症状的方法。优选地,制剂在肠溶包衣

的口服胶囊中。自身免疫病是例如非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、原发性胆汁性肝硬化 (PBC)、1型糖尿病、2型糖尿病或溃疡性结肠炎 (UC)。方法还包括向主体施用至少一种另外的活性剂。活性剂例如是NF- κ B抑制剂、GLP-1或 β 细胞静息化合物、美沙拉嗪或另一种5-ASA药物、己酮可可碱、熊去氧胆酸、PPAR γ 激动剂、全反式维甲酸 (ATRA)、DPP-4 (格列汀类-西他列汀)、脂肪酸合成抑制剂 (如浅蓝菌素、槲皮素、C7、芹菜素、AICAR)、FXR激动剂 (如胆汁盐活化剂、鹅去氧胆酸、奥贝胆酸 (OIBA、Ocaliva)、fexaramine、咖啡醇、胆汁酸螯合剂 (消胆胺、降胆宁、coleserelam)、SGLT2抑制剂 (前达格列净 (ex-dapagliflozin) (降低HbA1c水平)、抗IL-6R mAb、抗TNF抗体 (Remicade® (英利昔单抗) 和Humira® (阿达木单抗)、Enbrel® (依那西普) 抗炎和/或免疫抑制化合物 (如甲氨蝶呤、环孢菌素A环孢菌素微乳)、他克莫司、皮质类固醇、他汀类药物、干扰素 β 、醋酸格拉替雷 (Copaxone)、干扰素 β -1a (Avonex)、干扰素 β -1a (Rebif)、干扰素 β -1b (Betaseron或Betaferon)、米托蒽醌 (Novantrone)、地塞米松 (Decadron)、甲基强的松龙 (Depo-Medrol)、强的松 (Deltasone) 和抗肥胖药物。

[0018] 在另一方面,本发明提供了在主体中活化粘膜免疫和免疫调节的方法,其包括向有其需要的主体口服施用抗CD-3抗体。例如,方法包括施用任何根据本发明的制剂。优选地,制剂在肠溶包衣的口服胶囊中。

[0019] 在进一步的方面,本发明提供了活化调节性T细胞 (Tregs) 的方法,其包括向有其需要的主体口服施用抗CD-3抗体。例如,方法包括施用任何根据本发明的制剂。优选地,制剂在肠溶包衣的口服胶囊中。

[0020] 本发明进一步提供含有抗体液体制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗体液体制剂具有单位剂量的抗体或其抗原结合片段、20%海藻糖 (w/v) 和0.1%甲硫氨酸 (w/v)。抗体具有IgG1同种型。

[0021] 本发明还提供了含有抗体冻干制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗体冻干制剂具有单位剂量的抗体或其抗原结合片段和每mg抗体或其抗原结合片段约34mg海藻糖和0.17mg甲硫氨酸。抗体具有IgG1同种型。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些相似或等同的方法和材料可用于本发明的实践中,但在下文中描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用明确地整体并入。在冲突的情况下,将以本说明书 (包括定义) 为准。此外,本文所述的材料、方法和实施例仅是说明性的,而不意欲是限制性的。

[0022] 本发明的其他特征和优点根据下面的详细描述和权利要求将是显而易见的,且被包括在下面的详细描述和权利要求中。

附图说明

[0023] 图1是显示时间和温度对NI-0401制剂的影响的柱形图:SEC-HPLC:总面积 (AUC)。

[0024] 图2是显示时间和温度对NI-0401制剂的影响的柱形图:SEC-HPLC:%杂质。

[0025] 图3是显示时间和温度对透析的冻干NI-0401制剂迭代#2的稳定性的影响的SDS凝胶的照片:非还原SDS PAGE:T0&T14。

[0026] 图4是显示未透析的先导 (lead) 制剂 (10%海藻糖) 玻璃化转变温度 (tg) 的比較的图,10%海藻糖0.1%甲硫氨酸相比于20%海藻糖+/-EDTA;反向热流变化的叠加。

[0027] 图5是显示时间和温度对冻干的先导NI-0401制剂的影响的柱形图:SEC-HPLC:%主峰:T14保持在50°C和4°C 50°C。

[0028] 图6是显示时间和温度对NI-0401先导冻干制剂的影响的柱形图:SEC-HPLC:总峰AUC:T14保持在50°C和4°C。

[0029] 图7是显示时间和温度对NI-0401冻干制剂的影响的柱形图:SEC-HPLC:%总杂质:T14保持在50°C和4°C。

[0030] 图8是显示时间和温度对NI-0401冻干制剂的影响的柱形图:SEC-HPLC:相对于T0的%T14总峰回收率。

[0031] 图9是显示时间和温度对NI-0401冻干制剂的影响的柱形图:SEC-HPLC:相对于T0的%T14主峰回收率。

[0032] 图10是显示时间和温度对T0和T14的先导冻干制剂稳定性的影响的SDS凝胶的照片:非还原SDS-PAGE。

[0033] 图11是显示时间和温度对T0和T14的先导冻干制剂稳定性的影响的SDS凝胶的照片:还原SDS-PAGE。

[0034] 图12是显示时间和温度对T0和T14的先导冻干制剂稳定性的影响的IEF凝胶的照片:凝胶IEF*泳道1、4、8和10是pI标志物,且上样量为5、10、15和20 μ l。

[0035] 图13是显示T0-Lyo的当前NI-0401制剂的典型cIEF谱和分析的图。

[0036] 图14是显示冻干后NI-0401的毛细管等电聚焦(cIEF)分析的图。在步骤1中使用30KV电压15分钟进行cIEF,在步骤2中使用30KV电压30分钟进行cIEF。NI-0401的pI值为~9.25(碱性)。

[0037] 图15是显示T0和T14的先导制剂相比于当前制剂中NI-0401异质群体分布的柱状图。

[0038] 图16是显示与饼(cake)的外观和完整性相关的如通过SEC-HPLC分析所测定的foralumab的稳定性和纯度的照片。含有精氨酸和抗坏血酸的制剂显示出最高的塌陷量和材料损失。

[0039] 图17是显示在4°C或50°C下T14(冻干后14天)的冻干的先导制剂的饼外观的照片。(1)对照制剂,仅缓冲液,(2)20%海藻糖+0.1%甲硫氨酸和(3)20%海藻糖+0.1%甲硫氨酸+0.1%EDTA。NI-0401在含有海藻糖和甲硫氨酸的制剂中显示出完整的饼。在对照制剂中看到更多的塌陷。

[0040] 图18是显示凝固温度、融解温度和玻璃化转变温度的MDSC(调制差示扫描量热法)测定的图。

[0041] 图19A和B:在非还原(A)和还原(B)条件下的冻干制剂中NI-0401的SDS-PAGE分析。图19A:NI-0401-迭代#3未透析的-T0&T14 Lyo NR凝胶;图19B:NI-0401-迭代#3未透析的-T0&T14 Lyo还原凝胶。在环境(T0)或在4°C或50°C下储存14天后(T14)的冻干循环后,没有观察到NI-0401抗体的纯度变化。抗体的纯度大于98%,但在T14和50°C下的对照缓冲液中,纯度在非还原条件下下降到85%。

[0042] 图20是显示通过SEC-HPLC分析forlaumab的线性浓度以确定抗体纯度的线图。

[0043] 图21A-C是显示在T0(A)、4°C下T14(B)和40°C下T14(C)的冻干Foralumab制剂的SEC-HPLC分析的系列图。与对照制剂相比,先导制剂显示出优异的稳定性和没有杂质。

[0044] 图22A-C是显示用于检测杂质的以36.78 μ g或6 μ l注射的代表性SEC-HPLC色谱图的图。满量程(A)。扩展量程(B)。叠加(C)。

[0045] 图23A和B是显示在50 $^{\circ}$ C下14天的冻干物质是稳定的色谱图。满量程(A)。放大的(B)。图23A:显示NI0401先导制剂vs对照制剂:50 $^{\circ}$ C下保持T14的色谱图的叠加;图23B:显示NI0401先导制剂vs对照制剂:50 $^{\circ}$ C下保持T14Lyo的色谱图的叠加(放大)。

[0046] 图24A-D是显示冻干后的foralumab先导制剂的纯度的系列色谱图。两种先导制剂在冻干后均显示>98%的纯度(SEC-HPLC)。

[0047] 图25是显示未配制的foralumab的SEC-HPLC的色谱图,所述SEC-HPLC显示在对照和甘露醇制剂中看到的更高的主峰降解为杂质。

[0048] 图26是显示与对照制剂(缓冲液)相比的先导制剂的玻璃化转变温度的图。-30-37 $^{\circ}$ C的玻璃化转变温度防止冻干饼的塌陷。在冻干过程后对NI-0401先导制剂的MDSC(调制差示扫描量热法)分析。不同退火温度下的MDSC分析。融解、凝固和玻璃化转变温度表明,先导制剂具有最小的冻干饼塌陷,因为它们高于玻璃化转变温度。

[0049] 图27是图28的图例标示。

[0050] 图28是显示PBMC用不同的NI-0401制剂或安慰剂对照染色的系列图。

[0051] 图29是显示系列四倍稀释未表明NI-0401试剂1-15的结合的显著差异的线图。

[0052] 图30显示了测试不同NI-0401制剂功能的刺激方案。

[0053] 图31显示NI-0401的不同冷冻制剂诱导相似水平的增殖。

[0054] 图32A-C是显示在-80 $^{\circ}$ C或50 $^{\circ}$ C下存储的冻干的抗体显示出不同的刺激能力的系列柱状图。所有均于25mM乙酸钠/125mM NaCl、0.02%聚山梨酯80pH5.5,含有或不含有另外的试剂。图32A:冷冻的液体抗体(冷冻前置于RT);图32B:冻干的抗体(置于-80 $^{\circ}$ C);图32C:冻干的抗体(置于80 $^{\circ}$ C持续14d)。

[0055] 图33是本公开的经鼻抗CD3抗体制剂的给药方案和药物假期周期的示意图。

[0056] 图34是使用本公开的抗CD3抗体制剂和至少第二种药剂的组合疗法用于治疗溃疡性结肠炎的给药方案和药物假期周期的示意图。

[0057] 图35是使用本公开的抗CD3抗体制剂和至少第二种药剂的组合疗法用于治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的给药方案和药物假期周期的示意图。

[0058] 图36是使用本公开的抗CD3抗体制剂和至少第二种药剂的组合疗法用于治疗I型糖尿病的给药方案和药物假期周期的示意图。

[0059] 详述

本发明提供特异性针对CD3 ϵ 链(CD3 ϵ)的单克隆抗体、例如完全人单克隆抗体的制剂和剂量。具体地,本发明提供用于靶组织特异性免疫调节的抗CD3 ϵ 抗体的口服、经鼻和皮下制剂。不同地,抗CD3抗体的全身性(例如,静脉内)施用,本发明的制剂使脱靶免疫抑制最小化。本发明的制剂的另一个优异特征是由于施用的目标性质而以比先前可能的更低浓度的抗CD3抗体给药的能力。该制剂可用于治疗或减轻自身免疫病、炎性疾病、神经退行性疾病和癌症的症状。

[0060] CD3抗体

本发明提供了特异性针对CD3 ϵ 链(CD3 ϵ)的抗体的制剂。特异性针对CD3 ϵ 链(CD3 ϵ)的抗体及其抗原结合片段在本文中称为抗CD3抗体,并且制剂在本文中称为“抗CD3抗体

制剂”。本领域已知的任何抗CD3抗体都适用于本发明。抗CD3抗体是单克隆抗体。

[0061] 示例性的抗CD3抗体含有：包含氨基酸序列GYGMH (SEQ ID NO: 1)的重链互补决定区1(CDRH1)、包含氨基酸序列VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 3)的重链互补决定区2(CDRH2)、包含氨基酸序列QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 4)的重链互补决定区3(CDRH3)、包含氨基酸序列RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 5)的轻链互补决定区1(CDRL1)、包含氨基酸序列DASNRAT (SEQ ID NO: 6)的轻链互补决定区2(CDRL2)和包含氨基酸序列QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 7)的轻链互补决定区3(CDRL3)。

[0062] 在一些实施方案中,抗CD3抗体包含含有

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSK
KYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLV
TVSS (SEQ ID NO: 8)

的可变重链氨基酸序列和含有

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 9)

的可变轻链氨基酸序列。

[0063] 优选地,抗CD3抗体包含含有

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSK
KYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAE
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

的重链氨基酸序列和含有

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11)

的轻链氨基酸序列。该抗CD3抗体在本文中称为NI-0401、Foralumab或28F11-AE。(参见例如,Dean Y, Dépis F, Kosco-Vilbois M. “Combination therapies in the context of anti-CD3antibodies for the treatment of autoimmune diseases.”Swiss Med Wkly. (2012) (其内容以其整体通过引用并入本文)。

[0064] 在一些实施方案中,抗CD3抗体是完全人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,抗CD3抗体制剂包含全长抗CD3抗体。在可选的实施方案中,抗CD3抗体制剂包含特异性结合CD3的抗体片段。在一些实施方案中,抗CD3抗体制剂包含全长抗CD3抗体和特异性结合CD3的抗原结合片段的组合。

[0065] 在一些实施方案中,结合CD3的抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体、结构域抗

体、单链、Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。在一些实施方案中，结合CD3的这种抗体或其抗原结合片段是小鼠的、其他啮齿动物的、嵌合的、人源化的或完全人单克隆抗体。

[0066] 任选地，用于本公开制剂的抗CD3抗体或其抗原结合片段包含至少一个氨基酸突变。通常，突变位于恒定区。突变产生具有改变的效应子功能的抗体。通过改变，即增强或降低抗体对效应分子例如Fc受体或补体成分的亲和力来改变抗体的效应子功能。例如，突变产生能够减少自T细胞的细胞因子释放的抗体。例如，突变在重链中的氨基酸残基234、235、265或297或其组合处。优选地，突变产生位置234、235、265或297处的丙氨酸残基，或位置235处的谷氨酸残基，或其组合。

[0067] 优选地，本文提供的抗CD3抗体含有一种或多种突变，其防止体内重链恒定区介导的一种或多种细胞因子的释放。

[0068] 在一些实施方案中，用于本公开制剂的抗CD3抗体或其抗原结合片段是完全人抗体。本文使用的完全人CD3抗体包括例如Fc区中的L²³⁴L²³⁵→A²³⁴E²³⁵突变，从而使得在暴露于抗CD3抗体的细胞因子释放被显著减少或消除。当抗CD3抗体暴露于人白细胞时，本文中提供的抗CD3抗体的Fc区中的L²³⁴L²³⁵→A²³⁴E²³⁵突变减少或消除细胞因子释放，而以下描述的突变保持显著细胞因子释放能力。例如，通过比较暴露于Fc区中具有L²³⁴L²³⁵→A²³⁴E²³⁵突变的抗CD3抗体时的细胞因子释放与暴露于具有如下所述的一种或多种突变的另一种抗CD3抗体时的细胞因子释放水平，来定义细胞因子释放的显著减少。Fc区中的其他突变包括例如L²³⁴L²³⁵→A²³⁴A²³⁵、L²³⁵→E²³⁵、N²⁹⁷→A²⁹⁷和D²⁶⁵→A²⁶⁵。

[0069] 术语“细胞因子”是指本领域已知的结合细胞表面上表达的细胞外受体且从而调节细胞功能的所有细胞因子，包括但不限于IL-2、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。

[0070] 制剂

抗CD3制剂包含单位剂量的抗CD3抗体，其范围为：约0.1mg至约50mg；约0.1mg至约25mg；或0.1mg至约10mg。例如，单位剂量为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9、9.5、10 mg或更多。优选地，单位剂量为0.5mg、2.5mg或5.0mg。

[0071] 抗CD3制剂可以是液体。例如，液体制剂是含水的。可选地，抗CD3制剂是冻干粉末。当抗CD3制剂是冻干粉末时，可以另外加入填充剂以为冻干饼提供足够的结构。这种另外的填充剂可以在储存时增加冻干饼的稳定性。可选地，该另外的填充剂可以有助于剂型例如口服胶囊的生产。填充剂在本文中描述并且包括多元醇例如海藻糖、甘露醇、麦芽糖、乳糖、蔗糖、山梨醇或甘油、淀粉、微晶纤维素、低水分微晶纤维素例如Avicel或聚乙二醇(PEG)。

[0072] 抗CD3抗体制剂包括一种或多种盐(缓冲盐)、一种或多种多元醇和一种或多种赋形剂。本发明的制剂还可含有缓冲剂或防腐剂。将抗CD3抗体制剂在溶液中在以下pH进行缓冲：约4至8的范围；约4至7的范围；约4至6的范围；约5至6的范围；或约5.5至6.5的范围。优选地，pH为5.5。

[0073] 盐的实例包括由以下酸制备的盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、硼酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。此类盐也可以制备成碱金属盐或碱土金属盐，例如钠盐、钾盐或钙盐。缓冲剂的实例包括磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐和2-(N-吗啉代)

乙磺酸(MES)。

[0074] 本发明的制剂可包括缓冲系统。如本申请中所用,术语“缓冲剂”或“缓冲系统”是指这样的化合物,其通常与至少一种其他化合物组合,提供在溶液中展示缓冲能力的缓冲系统,即在一定范围内中和酸或碱(碱)且原始pH相对较小改变或不改变的能力。

[0075] 缓冲剂包括硼酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、钙缓冲剂以及它们的组合和混合物。硼酸盐缓冲剂包括例如硼酸及其盐,例如硼酸钠或硼酸钾。硼酸盐缓冲剂还包括在溶液中产生硼酸或其盐的化合物,例如四硼酸钾或偏硼酸钾。

[0076] 磷酸盐缓冲系统包括一种或多种磷酸二氢盐、磷酸一氢盐等。特别有用的磷酸盐缓冲剂是选自碱金属和/或碱土金属的磷酸盐的那些。合适的磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)和磷酸二氢钾(KH_2PO_4)中的一种或多种。磷酸盐缓冲剂组分通常以0.01%或至0.5% (w/v)的量使用,以磷酸根离子计算。

[0077] 根据CD3制剂,可任选地加入其它已知的缓冲化合物,例如柠檬酸盐、碳酸氢钠、TRIS等。溶液中的其他成分虽然具有其他功能,但也可能影响缓冲能力。例如,通常用作络合剂的EDTA可对溶液的缓冲能力产生显著影响。

[0078] 用于本发明制剂的优选盐包括氯化钠、乙酸钠、三水乙酸钠和柠檬酸钠。

[0079] 根据本发明的制剂中盐的浓度为约10mM至500mM、约25m至250mM、约25nM至150mM。

[0080] 三水乙酸钠的浓度范围为约10mM至100mM。例如,三水乙酸钠为约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100mM。优选地,三水乙酸钠为25mM。

[0081] 氯化钠的浓度范围为约50mM至500mM。例如,氯化钠为约50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500mM。优选地,氯化钠的浓度为约125mM。

[0082] 柠檬酸钠的浓度范围为约10mM至100mM。例如,柠檬酸钠为约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100mM。优选地,柠檬酸钠的范围为约25至50mM。

[0083] 在一些实施方案中,盐是浓度范围为约25mm至100mm的三水乙酸钠和浓度范围为约150mm至500mm的氯化钠。

[0084] 优选地,制剂包含约25mM三水乙酸钠和约150mM氯化钠。

[0085] 制剂包含一种或多种多元醇作为填充剂和/或稳定赋形剂。多元醇包括例如海藻糖、甘露醇、麦芽糖、乳糖、蔗糖、山梨醇或甘油。多元醇的浓度范围为约0.1%至50%或5%至25%。例如,多元醇为约1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50%。

[0086] 在一些实施方案中,多元醇是海藻糖,其浓度范围为约1%至50%或5%至25%。例如,海藻糖为约1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50%。优选地,海藻糖的浓度为约10%或约20%。最优选地,海藻糖的浓度为约20%。

[0087] 在一些实施方案中,多元醇是山梨醇,其浓度范围为约1%至约10%。在一些实施方案中,多元醇是甘油,其浓度范围为约1%至约10%。

[0088] 在一些实施方案中,多元醇是甘露醇,其浓度范围为约0.1%至约10%。在一些实施方案中,多元醇是麦芽糖,其浓度范围为约1%至约10%。

[0089] 制剂包含一种或多种赋形剂和/或表面活性剂以抑制或以其他方式减少抗体聚集。作为非限制性实例,用于减少抗体聚集的合适赋形剂包括表面活性剂诸如聚山梨酯20或聚山梨酯80。在一些实施方案中,聚山梨酯20或聚山梨酯80以范围为约0.01至1%或约

0.01至0.05%的浓度存在。例如,聚山梨酯20或聚山梨酯80的浓度为约0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0%。

[0090] 优选地,表面活性剂是聚山梨酯80,其浓度范围为约0.01-0.05%。更优选地,聚山梨酯80为0.02%。

[0091] 制剂包含一种或多种赋形剂以减少抗体氧化。作为非限制性实例,减少抗体氧化的合适的赋形剂包括抗氧化剂。抗氧化剂包括例如甲硫氨酸、D-精氨酸、BHT或抗坏血酸。抗氧化剂以以下浓度范围存在:约0.01%至1%;0.1%至1%;或0.1%至0.5%。在一些实施方案中,抗氧化剂是甲硫氨酸。在一些实施方案中,抗氧化剂以以下浓度范围存在:约0.01%至1%;0.1%至1%;或0.1%至0.5%。例如,甲硫氨酸以约0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0%的浓度存在。优选地,甲硫氨酸为约0.1%。

[0092] 制剂包含一种或多种螯合剂,诸如例如乙二胺四乙酸(EDTA)。螯合剂以以下浓度范围存在:约0.01%至1%;0.1%至1%;或0.1%至0.5%。例如,螯合剂以约0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0%的浓度存在。优选地,螯合剂是EDTA,且浓度为约0.1%。

[0093] 在一些实施方案中,制剂包含一种或多种赋形剂以增加稳定性。在一些实施方案中,增加稳定性的赋形剂是人血清白蛋白。在一些实施方案中,人血清白蛋白以约1mg至约5mg的范围存在。

[0094] 在一些实施方案中,制剂包含硬脂酸镁(硬脂酸Mg)、氨基酸或硬脂酸镁和氨基酸两者。合适的氨基酸包括例如亮氨酸、精氨酸、组氨酸或其组合。

[0095] 在一些实施方案中,一种或多种另外的赋形剂是低水分微晶纤维素,例如Avicel、聚乙二醇(PEG)或淀粉。

[0096] 可用于本发明的制剂的药学上可接受的载体和赋形剂的其他实例包括但不限于粘合剂、填料、崩解剂、润滑剂、抗微生物剂、抗氧化剂和涂层剂,诸如:粘合剂:玉米淀粉、马铃薯淀粉、其他淀粉、明胶,天然和合成树胶如阿拉伯胶、黄原胶、海藻酸钠、海藻酸、其他海藻酸盐、粉末黄蓍胶、瓜尔胶、纤维素及其衍生物(例如乙基纤维素、醋酸纤维素、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠)、聚乙烯吡咯烷酮(例如聚维酮、交聚维酮、共聚维酮等)、甲基纤维素、Methocel、预糊化淀粉(例如,由Colorcon, Ltd.销售的STARCH 1500®和STARCH 1500 LM®)、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素(FMC Corporation, Marcus Hook, PA, USA)、Emdex、Plasdone或其混合物;填料:滑石、碳酸钙(如颗粒或粉末)、磷酸氢钙、磷酸三钙、硫酸钙(如颗粒或粉末)、微晶纤维素、粉状纤维素、dextrates、高岭土、甘露醇、硅酸、山梨醇、淀粉、预糊化淀粉、葡萄糖、果糖、蜂蜜、无水乳糖、乳糖一水合物、乳糖和阿斯巴甜、乳糖和纤维素、乳糖和微晶纤维素、麦芽糖糊精、麦芽糖、甘露醇、微晶纤维素&瓜尔豆胶、糖蜜、蔗糖或其混合物;崩解剂:琼脂-琼脂、海藻酸、碳酸钙、微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、波拉克林钾、羟基乙酸淀粉钠(如Explotab)、马铃薯或木薯淀粉、其他淀粉、预糊化淀粉、粘土、其他藻胶、其他纤维素、树胶(如结冷胶)、低取代羟丙基纤维素、poyplasdone、或其混合物;润滑剂:硬脂酸钙、硬脂酸镁、矿物油、轻质矿物油、甘油、山梨醇、甘露醇、聚乙二醇、其他二醇、compritol、硬脂酸、十二烷基硫酸钠、硬脂酰富马酸钠(如Pruv)、植物基脂肪酸润滑剂、滑石、氢化植物油(例如花生油、棉籽油、葵花籽油、芝麻油、橄

榄油、玉米油和大豆油)、硬脂酸锌、油酸乙酯、月桂酸乙酯、琼脂、syloid硅胶(AEROSIL 200, W.R. Grace Co., Baltimore, MD USA)、合成二氧化硅的凝聚型气溶胶(Deaussa Co., Piano, TX USA)、热解二氧化硅(CAB-0-SIL, Cabot Co., Boston, MA USA)、或其混合物;抗结剂:硅酸钙、硅酸镁、二氧化硅、胶体二氧化硅、滑石或其混合物;抗微生物剂:苯扎氯铵、苜索氯铵、苯甲酸、苯甲醇、对羟基苯甲酸丁酯、氯化十六烷基吡啶、甲酚、氯丁醇、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸甲酯、苯酚、苯乙醇、苯氧乙醇、醋酸苯汞、硝酸苯汞、山梨酸钾、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠、脱氢乙酸钠、丙酸钠、山梨酸、硫柳汞、百里酚酞(thymo)、或其混合物;抗氧化剂:抗坏血酸、BHA、BHT、EDTA、或其混合物;和涂层剂:羧甲基纤维素钠、邻苯二甲酸乙酸纤维素、乙基纤维素、明胶、药用釉(pharmaceutical glaze)、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素(羟丙甲纤维素)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基纤维素、聚乙二醇、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯、虫胶、蔗糖、二氧化钛、巴西棕榈蜡、微晶蜡、结冷胶、麦芽糖糊精、甲基丙烯酸酯、微晶纤维素和角叉菜胶、或其混合物。

[0097] 制剂还可包含其他赋形剂及其类别,包括但不限于Pluronic®、泊洛沙姆(例如Lutrol®和泊洛沙姆188)、抗坏血酸、谷胱甘肽、蛋白酶抑制剂(例如大豆胰蛋白酶抑制剂、有机酸)、pH降低剂、霜剂和乳液(如麦芽糖糊精和角叉菜胶);用于咀嚼片材料(如葡萄糖、果糖、乳糖一水合物、乳糖和阿斯巴甜、乳糖和纤维素、麦芽糖糊精、麦芽糖、甘露醇、微晶纤维素和瓜尔胶、山梨醇晶体);肠胃外药物(如甘露醇和聚维酮);增塑剂(如癸二酸二丁酯、涂层用增塑剂、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯);粉末润滑剂(如山嵛酸甘油酯);软明胶胶囊(如山梨醇专用溶液);涂层用球体(如糖球体);球化剂(spheronization agents)(如山嵛酸甘油酯和微晶纤维素);悬浮/胶凝剂(如角叉菜胶、结冷胶、甘露醇、微晶纤维素、聚维酮、羟基乙酸淀粉钠、黄原胶);甜味剂(如阿斯巴甜、阿斯巴甜和乳糖、葡萄糖、果糖、蜂蜜、麦芽糖糊精、麦芽糖、甘露醇、糖蜜、山梨醇晶体、山梨醇专用溶液、蔗糖);湿法造粒剂(如碳酸钙、无水乳糖、乳糖一水合物、麦芽糖糊精、甘露醇、微晶纤维素、聚维酮、淀粉)、焦糖、羧甲基纤维素钠、樱桃奶油香料和樱桃香料、无水柠檬酸、柠檬酸、糖粉、D&C红33号、D&C黄#10铝色淀、乙二胺四乙酸二钠、乙醇15%、FD&C黄6号铝色淀、FD&C蓝#1铝色淀、FD&C蓝1号、FD&C蓝2号铝色淀、FD&C绿3号、FD&C红40号、FD&C黄6号铝色淀、FD&C黄6号、FD&C黄10号、甘油棕榈酸硬脂酸酯、甘油单硬脂酸酯、靛蓝胭脂红、卵磷脂、甘露醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、甘草酸单铵、天然和人工橙香料、药用釉、泊洛沙姆188、聚葡萄糖、聚山梨酯20、聚山梨酯80、聚维酮、预胶化玉米淀粉、预胶化淀粉、红氧化铁、糖精钠、羧甲基醚钠、氯化钠、柠檬酸钠、磷酸钠、草莓香料、合成黑氧化铁、合成红氧化铁、二氧化钛和白蜡。

[0098] 在一些实施方案中,抗CD3制剂是液体并且乙酸钠的浓度为约10mM至500mM;氯化钠的浓度为约10mM至500mM;聚山梨酯80的浓度为约0.01%至1% (w/v);海藻糖的浓度为约5%至50% (w/v);并且甲硫氨酸的浓度为0.01%至1% (w/v)。任选地,制剂还包含浓度为约0.01%至1% (w/v)的EDTA。抗CD3抗体或其抗原结合片段的单位剂量范围为约0.1mg至10mg。在一些实施方案中,将液体制剂冻干以形成粉末。

[0099] 在一些实施方案中,抗CD3制剂是液体并含有25mM乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)、0.1%甲硫氨酸 (w/v)和单位剂量的范围为约0.1mg至10mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段。任选地,制剂还包含0.1%EDTA (w/v)。在一些实施

方案中,将液体制剂冻干以形成粉末。

[0100] 在一个具体实施方案中,液体抗CD3制剂包含25mM乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)、0.1%甲硫氨酸 (w/v)和0.5mg单位剂量的抗CD3抗体或抗原结合片段。本发明还包括该制剂的冻干粉末。

[0101] 在一个具体实施方案中,液体抗CD3制剂包含25mM乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)、0.1%甲硫氨酸 (w/v)和0.2.5 mg单位剂量的抗CD3抗体或抗原结合片段。。本发明还包括该制剂的冻干粉末。

[0102] 在一个具体实施方案中,液体抗CD3制剂包含25mM乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)、0.1%甲硫氨酸 (w/v)和5.0 mg单位剂量的抗CD3抗体或抗原结合片段。本发明还包括该制剂的冻干粉末。

[0103] 在一个具体实施方案中,液体抗CD3制剂包含25mM乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)、0.1%甲硫氨酸 (w/v)、0.1% EDTA (w/v)和0.5mg单位剂量的抗CD3抗体或抗原结合片段。本发明还包括该制剂的冻干粉末。

[0104] 在一个具体实施方案中,液体抗CD3制剂包含25mM乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)、0.1%甲硫氨酸 (w/v)、0.1% EDTA (w/v)和0.2.5 mg单位剂量的抗CD3抗体或抗原结合片段。本发明还包括该制剂的冻干粉末。

[0105] 在一个具体实施方案中,液体抗CD3制剂包含25mM乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)、0.1%甲硫氨酸 (w/v)、0.1% EDTA (w/v)和5.0 mg单位剂量的抗CD3抗体或抗原结合片段。本发明还包括该制剂的冻干粉末。

[0106] 在一些实施方案中,制剂是冻干粉末,其中抗CD3抗体或抗原结合片段与聚山梨酯80的比例为约1:0.01至0.1 (w/w);抗CD3抗体或抗原结合片段与海藻糖的比例为约1:10至50 (w/w);抗CD3抗体或抗原结合片段与甲硫氨酸的比例为约1:0.1至0.5 (w/w);抗CD3抗体或抗原结合片段与乙酸钠的比例为约1:0.1至1.0 (w/w);且抗CD3抗体或抗原结合片段与氯化钠的比例为约1:0.5至2.0 (w/w)。任选地,制剂还包含EDTA,其中抗CD3抗体或抗原结合片段与EDTA的比例为约1:0.1至0.5 (w/w)。抗CD3抗体或其抗原结合片段的单位剂量范围为约0.1mg至10mg。

[0107] 在一些实施方案中,抗CD3制剂是粉末,例如冻干粉末,其具有单位剂量的约0.1mg至10mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg的三水乙酸钠、约1.25mg氯化钠、约0.034mg聚山梨酯80、约34mg海藻糖和约0.17mg甲硫氨酸。任选地,粉末制剂还包含每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段0.17mg EDTA。优选地,单位剂量为0.5mg、2.5mg或5.0mg。

[0108] 在一个具体实施方案中,抗CD3制剂是粉末,例如冻干粉末,其具有单位剂量的约0.5mg抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸钠、约1.25mg氯化钠、约0.034mg聚山梨酯80、约34mg海藻糖和约0.17mg甲硫氨酸。

[0109] 在一个具体实施方案中,抗CD3制剂是粉末,例如冻干粉末,其具有单位剂量的约2.5 mg抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸钠、约1.25mg氯化钠、约0.034mg聚山梨酯80、约34mg海藻糖和约0.17mg甲硫氨酸。

[0110] 在一个具体实施方案中,抗CD3制剂是粉末,例如冻干粉末,其具有单位剂量的约5 mg抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸

钠、约1.25mg氯化钠、约0.034mg聚山梨酯80、约34mg海藻糖和约0.17mg甲硫氨酸。

[0111] 在一个具体实施方案中,抗CD3制剂是粉末,例如冻干粉末,其具有单位剂量的约0.5 mg抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸钠、约1.25mg氯化钠、约0.034mg聚山梨酯80、约34mg海藻糖、约0.17 mg EDTA和约0.17mg甲硫氨酸。

[0112] 在一个具体实施方案中,抗CD3制剂是粉末,例如冻干粉末,其具有单位剂量的约2.5 mg抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸钠、约1.25mg氯化钠、约0.034mg聚山梨酯80、约34mg海藻糖、约0.17 mg EDTA和约0.17mg甲硫氨酸。

[0113] 在一个具体实施方案中,抗CD3制剂是粉末,例如冻干粉末,其具有单位剂量的约5 mg抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸钠、约1.25mg氯化钠、约0.034mg聚山梨酯80、约34mg海藻糖、约0.17 mg EDTA和约0.17mg甲硫氨酸。

[0114] 根据本发明的制剂(呈液体、冻干或最终剂型(例如胶囊))的水分(即水)含量小于约7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。优选地,水分含量范围为2-5%,更优选水分含量范围为1-2%,最优选水分含量小于1%。确定水分含量的方法是本领域已知的,例如水分含量通过Karl Fischer滴定法测定。

[0115] 在一些实施方案中,制剂的重量摩尔渗透压浓度为约800-950(例如,约825-925)mOsm/kg。

[0116] 本发明的抗CD3抗体制剂(呈液体、冻干或最终剂型(例如胶囊))适于在约2°C至约4°C、15°C或环境温度下储存。在一些实施方案中,制剂与干燥剂分子筛包一起储存,以在储存期间减少水分。在一些实施方案中,将制剂储存在容器(例如瓶或其他合适的容器)中,且具有干燥剂分子筛包以在储存期间减少水分。

[0117] 本发明的制剂(呈液体、冻干或最终剂型(例如胶囊))提供制剂的经配制的抗体和其它任选活性剂的化学稳定性。在此上下文中,“稳定性”和“稳定的”是指抗体和其他任选的活性剂在给定的制造和制备、运输和储存条件下对化学降解和物理变化例如沉降、沉淀、聚集的抗性。在给定的制造、制备、运输和/或储存条件下,本发明的“稳定”制剂还优选保留至少90%、95%、98%、99%或99.5%的起始或参考量。抗体和其它任选活性剂的量可以使用任何本领域公认的方法测定,例如作为UV-Vis分光光度法和高压液相色谱法(HPLC)、或SDS-PAGE。

[0118] 本发明的抗CD3抗体制剂(呈液体、冻干或最终剂型(例如胶囊))在4°C、15°C或环境温度下稳定至少3个月。制剂在4°C或15°C下稳定大于3个月,例如,在4°C、15°C或环境温度下,稳定至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月和/或大于24个月。

[0119] 本发明的抗CD3抗体制剂(呈液体、冻干或最终剂型(例如胶囊))具有至少90%、91%、92%、95%、95%、97%、98%、99%或更多IgG作为重链和轻链的纯度。

[0120] 本发明的抗CD3抗体制剂(呈液体、冻干或最终剂型(例如胶囊))具有少于5%、4%、3%、2%、1%的总杂质。

[0121] 本发明的抗CD3抗体制剂(呈液体、冻干或最终剂型(例如胶囊))具有至少90%、

91%、92%、95%、95%、97%、98.5%、99%或更多的IgG单体。

[0122] 本发明的抗CD3抗体制剂(呈液体、冻干或最终剂型(例如胶囊))具有小于5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%的总IgG聚集体。

[0123] 剂型

本发明的制剂可以具体配制用于肠内、肠胃外或经鼻施用。

[0124] 对于肠内施用,即口服,制剂可以是胶囊或片剂。肠胃外施用包括静脉内、皮下、肌内和关节内施用,并且可以是密封小瓶或其他容器中的液体或冻干粉末。

[0125] 对于经鼻施用,制剂可以是密封小瓶或其他合适容器中的气溶胶。

[0126] 胶囊包括软胶囊或硬壳胶囊。软胶囊是软凝胶或明胶或明胶样材料。硬壳胶囊或软胶囊是HPMC胶囊。胶囊(软胶囊或硬壳胶囊)可以用液体抗CD3制剂或粉末状例如冻干的抗CD3制剂填充。示例性的液体和粉末状抗CD3制剂描述于上文。

[0127] 在一些实施方案中,每个胶囊包括足以避开胃酸度的肠溶包衣。任何合适的肠溶包衣可用于口服抗CD3抗体制剂,包括但不限于肠溶包衣例如Eudragit[®],例如,Eudragit[®] L 30 D / L 100-55,其在高于4或5的pH下释放抗CD3抗体。

[0128] 在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂中的每个胶囊包含软凝胶或明胶或明胶样材料,其尺寸范围为0至2,例如,尺寸0、尺寸1和/或尺寸2。

[0129] 在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂中的胶囊是液体填充的硬胶囊(LFHC)。任何合适的LFHC可用于本公开的口服抗CD3抗体制剂中,包括但不限于,Licaps[®]和Capsugel[®]的其他LFHC。

[0130] 在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂中的每个液体填充胶囊含有小于约1000 μ L、例如小于约75 μ L、和/或小于约500 μ L的体积。在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂中的每个液体填充的胶囊含有的体积范围为约50 μ L至约1000 μ L、约100 μ L至约1000 μ L、约200 μ L至约1000 μ L、约250 μ L至约1000 μ L、约50 μ L至约500 μ L、约100 μ L至约500 μ L、约200 μ L至约500 μ L、和/或约250 μ L至约500 μ L。

[0131] 优选的口服制剂包括含有抗CD3抗体冻干制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗CD3抗体冻干制剂具有单位剂量的约0.1mg至10mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg的三水乙酸钠、约1.25mg氯化钠、约0.034mg聚山梨酯80、约34mg海藻糖和约0.17mg甲硫氨酸。任选地,肠溶包衣的口服胶囊还包含每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段0.17mg EDTA。单位剂量为0.5mg、2.5mg或5.0mg。

[0132] 另一优选的口服制剂包括含有抗CD3抗体液体制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗CD3抗体液体制剂包含单位剂量的约0.1mg至10mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段、25mM三水乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)和0.1%甲硫氨酸 (w/v)。任选地,肠溶包衣的口服胶囊还包含0.1%EDTA。单位剂量为0.5mg、2.5mg或5.0mg。

[0133] 在一些实施方案中,抗CD3抗体制剂是皮下制剂。在一些实施方案中,将皮下抗CD3抗体制剂置于密封的小瓶或其他容器中。

[0134] 在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂包含抗CD3抗体、至少一种盐、至少一种表面活性剂和使制剂达到期望注射体积所需的一定体积的水。

[0135] 在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂包含约2mg/mL的抗CD3抗体、约7.31mg氯化钠、约3.40mg三水乙酸钠、约0.20mg聚山梨酯80和其量使制剂体积达到1ml期望注射体积

的水。皮下抗CD3制剂应该为约4至6范围内的pH。

[0136] 在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂在冷藏(例如,在约2°C至约8°C的范围内)下储存在小瓶或其他合适的容器中。在一些实施方案中,不摇动皮下抗CD3抗体制剂。在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂未冷冻。在一些实施方案中,在施用前稀释皮下抗CD3抗体制剂。

[0137] 在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂以约1mg/60kg体重至约10mg/60kg体重范围的剂量施用。

[0138] 在一些实施方案中,抗CD3抗体制剂是经鼻制剂。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂是气溶胶制剂。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂适合每日一次施用。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂以每天一次约0.1mg至约10mg范围的剂量提供抗CD3抗体的气溶胶。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂以每天一次约0.1mg至约10mg范围的剂量提供抗CD3抗体片段的气溶胶。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂以每天一次约0.1mg至约10mg范围的剂量提供抗CD3抗体的气溶胶。

[0139] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包含粒径范围为约1mm至约5mm的颗粒群。

[0140] 颗粒制剂的颗粒具有约1mm至约5mm的直径,例如,直径小于5mm,直径小于4mm,直径小于3mm,直径小于2mm,和直径约1毫米。

[0141] 包含抗CD3抗体或其抗原结合片段的颗粒制剂的颗粒具有约0.1mm至约50mm的平均直径。包含抗CD3抗体或其抗原结合片段的颗粒制剂的颗粒具有约1mm至约10mm的平均直径,例如平均直径小于10mm,平均直径小于9mm,平均直径小于8mm,平均直径小于7mm,平均直径小于6mm,平均直径小于5mm,平均直径小于4mm,平均直径小于3mm,和平均直径约2mm。在一些实施方案中,颗粒具有约2mm至5mm的平均直径。在一些实施方案中,颗粒具有2mm至5mm的平均直径,其中每个颗粒的直径小于约50mm。

[0142] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包含全长抗CD3抗体。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包含特异性结合CD3的抗体片段。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包含全长抗CD3抗体和特异性结合CD3的抗原结合片段的组合。

[0143] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包括溶液,其包含剂量范围为约0.1mg至约10mg的抗CD3抗体、浓度范围为约25mm至约50mm的柠檬酸盐缓冲剂和浓度为约150mm的盐,其中溶液的pH值在约4至6的范围内。

[0144] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包括溶液,其包含剂量范围为约0.1mg至约10mg的抗CD3抗体、浓度范围为约25mm至约50mm的柠檬酸钠缓冲剂和浓度为约150mm的氯化钠,其中溶液的pH值在约4至6的范围内。

[0145] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包括溶液,其包含剂量范围为约0.1mg至约10mg的抗CD3抗体片段、浓度范围为约25mm至约50mm的柠檬酸盐缓冲剂和浓度为约150mm的盐,其中溶液的pH值在约4至6的范围内。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包括溶液,其包含剂量范围为约0.1mg至约10mg的抗CD3抗体片段、浓度范围为约25mm至约50mm的柠檬酸钠缓冲剂和浓度为约150mm的氯化钠,其中溶液的pH值在约4至6的范围内。

[0146] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包括溶液,其包含剂量范围为约0.1mg至约10mg的全长NI-0401抗体、浓度范围为约25mm至约50mm的柠檬酸盐缓冲剂和浓度为约150mm的盐,其中溶液的pH值在约4至6的范围内。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包

括溶液,其包含剂量范围为约0.1mg至约10mg的全长NI-0401抗体、浓度范围为约25mm至约50mm的柠檬酸钠缓冲剂和浓度为约150mm的氯化钠,其中溶液的pH值在约4至6的范围内。

[0147] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包括溶液,其包含剂量范围为约0.1mg至约10mg的NI-0401抗体片段、浓度范围为约25mm至约50mm的柠檬酸盐缓冲剂和浓度为约150mm的盐,其中溶液的pH值在约4至6的范围内。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包括溶液,其包含剂量范围为约0.1mg至约10mg的NI-0401抗体片段、浓度范围为约25mm至约50mm的柠檬酸钠缓冲剂和浓度为约150mm的氯化钠,其中溶液的pH值在约4至6的范围内。

[0148] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包含一种或多种多元醇作为稳定赋形剂。在一些实施方案中,多元醇是甘露醇,其浓度范围为约0.1%至约10%。在一些实施方案中,多元醇是海藻糖,其浓度范围为约0.1%至约1%。在一些实施方案中,多元醇是山梨醇,其浓度范围为约1%至约10%。在一些实施方案中,多元醇是甘油,其浓度范围为约1%至约10%。在一些实施方案中,多元醇是浓度范围为约0.1%至约10%的甘露醇和浓度范围为约0.1%至约1%的海藻糖。在一些实施方案中,多元醇是浓度范围为约0.1%至约10%的甘露醇和浓度范围为约1%至约10%的山梨醇。在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包含一种或多种多元醇作为稳定赋形剂,和浓度范围为约1%至约10%的甘油。在一些实施方案中,多元醇是浓度范围为约0.1%至约1%的海藻糖和浓度范围为约1%至约10%的山梨醇。在一些实施方案中,多元醇是浓度范围为约0.1%至约1%的海藻糖和浓度范围为约1%至约10%的甘油。在一些实施方案中,多元醇是浓度范围为约1%至约10%的山梨醇和浓度范围为约1%至约10%的甘油。在一些实施方案中,多元醇是浓度范围为约0.1%至约10%的甘露醇、浓度范围为约0.1%至约1%的海藻糖以及浓度范围为约1%至约10%的山梨醇。在一些实施方案中,多元醇是浓度范围为约0.1%至约10%的甘露醇、浓度范围为约0.1%至约1%的海藻糖以及浓度范围为约1%至约10%的甘油。在一些实施方案中,多元醇是浓度范围为约0.1%至约1%的海藻糖、浓度范围为约1%至约10%的山梨醇以及浓度范围为约1%至约10%的甘油。在一些实施方案中,多元醇是浓度范围为约0.1%至约10%的甘露醇、浓度范围为约0.1%至约1%的海藻糖、浓度范围为约1%至约10%的山梨醇,和多元醇是浓度范围为约1%至约10%的甘油。

[0149] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂包含一种或多种表面活性剂,例如作为非限制性实例,聚山梨酯20或聚山梨酯80。在一些实施方案中,聚山梨酯20或聚山梨酯80以范围为约0.01%至约0.05%的浓度存在。

[0150] 在一些实施方案中,经鼻抗CD3抗体制剂适合于在约2°C至约4°C下储存。在一些实施方案中,将经鼻抗CD3抗体制剂储存在密封的小瓶或其他合适的容器中。在一些实施方案中,将经鼻抗CD3抗体制剂在约2°C至约4°C下储存在密封的小瓶或其他合适的容器中。

[0151] 应当理解,根据本公开的治疗实体的施用将与合适的载体、赋形剂和掺入制剂中以提供改善的转移、递送、耐受性等的其他试剂一起施用。多种合适的制剂可见于所有药物化学家公知的处方集中:Remington's Pharmaceutical Sciences (第15版, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)),特别是其中Blaug, Seymour的第87章。这些制剂包括例如粉剂、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含有脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(例如Lipofectin™)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳剂、乳剂carbowax(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有carbowax的半固体混合物。任何前述混合物均可

适合于根据本发明的治疗和疗法,条件是制剂中的活性成分不被制剂失活,并且制剂是生理上相容的并且可以与施用途径相容。还参见Baldrick P. “Pharmaceutical excipient development:the need for preclinical guidance.”Regul.Toxicol Pharmacol.32(2):210-8 (2000)、Wang W. “Lyophilization and development of solid proteinpharmaceuticals.”Int. J. Pharm.203(1-2):1-60 (2000)、Charman WN “Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-someemerging concepts.”J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000)、Powell 等人“Compendium of excipients for parenteral formulations” PDA J Pharm Sci Technol.52:238-311 (1998)及其中与药物化学家熟知的制剂、赋形剂和载体相关的其他信息的引用。

[0152] 治疗性施用

本文提供的治疗性制剂,其包含本文公开的抗CD3抗体制剂,用于治疗或减轻与免疫相关病症例如自身免疫病或炎性疾病相关的症状。本文公开的抗CD3抗体制剂还用于治疗或减轻与神经退行性疾病或癌症相关的症状。

[0153] 自身免疫病包括,例如,获得性免疫缺陷综合症(AIDS,其是具有自身免疫成分的病毒性疾病)、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病(AIED)、自身免疫性淋巴增生综合征(ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、白塞病、心肌病、口炎性腹泻-疱疹性皮炎(celiac sprue-dermatitis hepeticiformis);慢性疲劳免疫功能紊乱综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIPD)、瘢痕性天疱疮、冷凝集素病、CREST综合征、克罗恩病、德戈斯病、皮炎-青少年、盘状狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病(I型糖尿病;2型糖尿病)、青少年慢性关节炎(Still病)、青少年类风湿性关节炎、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、恶性贫血(pernicious anemia)、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、雷诺现象、Reiter综合征、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病(进行性系统性硬化症(PSS),又称系统性硬化症(SS))、干燥综合征、僵人综合征、系统性红斑狼疮、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、白癜风和韦格内肉芽肿。

[0154] 炎性疾病包括例如慢性和急性炎性疾病。炎性疾病的实例包括阿尔茨海默病、哮喘、特应性过敏、过敏、动脉粥样硬化、支气管哮喘、湿疹、肾小球性肾炎、移植物抗宿主病、溶血性贫血、炎性肠病(IBD)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、骨关节炎、败血症、中风、组织器官移植、血管炎、糖尿病视网膜病变和呼吸机引起的肺损伤。

[0155] 将抗CD3抗体的制剂施用给患有免疫相关病症的主体,例如自身免疫病或炎性疾病、神经退行性疾病或癌症。通过本领域已知的方法鉴定患有自身免疫病、炎性疾病、神经退行性疾病或癌症的主体。例如,使用各种临床和/或实验室测试例如体检、放射检查以及血液、尿液和粪便分析评估免疫状态来鉴定患有自身免疫病(例如克罗恩病、溃疡性结肠炎或炎性肠病)的主体。例如,例如通过使用磁共振将在时间和空间上散播(即,间隔至少三个月,在CNS的不同部分中发生)的中枢神经系统(CNS)病变的存在成像来鉴定患有多发性硬

化症的患者。使用例如血液测试和/或X射线或其他成像评估来鉴定患有类风湿性关节炎的患者。当以下这些测试中的任何三种为阳性随后为另一天的第二次阳性测试时,鉴定患有I型糖尿病的患者:(1)空腹血糖大于或等于126 mg/dl并伴有糖尿病症状;(2)临时血糖(在一天中的任何时间采样)大于或等于200 mg/dl并伴有糖尿病症状;或(3)以2小时间隔测量的口服葡萄糖耐量试验(OGTT)值大于或等于200mg/dl (OGTT在3小时的时间跨度内给予)。

[0156] 如果实现任何各种实验室或临床结果,则认为向患有免疫相关病症例如自身免疫病、炎性疾病、神经退行性疾病或癌症的患者施用抗CD3抗体剂是成功的。例如,如果与该病症相关的一种或多种症状得到缓解、减轻、抑制或者未进展到进一步(即更坏的)状态,则认为向患有免疫相关病症例如自身免疫病或炎性疾病的患者施用抗CD3抗体剂是成功的。如果病症(例如自身免疫病)进入缓解期或未进展到进一步(即更坏的)状态,则认为向患有免疫相关疾病例如自身免疫病或炎性疾病的患者施用抗CD3抗体剂是成功的。

[0157] 在另一个实施方案中,本文提供的抗CD3抗体剂用于治疗、诊断和/或预防非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。非酒精性脂肪性肝炎是由于酒精以外的原因引起的脂肪肝疾病。NASH与症状诸如贫血、疲劳、体重减轻、虚弱相关,并在后期与肝硬化相关。将本文提供的抗CD3抗体剂施用于患有NASH、已经诊断患有NASH或易患NASH的主体。本文提供的抗CD3抗体剂以足以在主体中减轻NASH的至少一种症状,治疗NASH,预防NASH和/或防止NASH进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0158] 本文提供的抗CD3抗体剂用于治疗、诊断和/或预防炎性肠病(IBD)。IBD是胃肠(GI)道中组织的慢性炎症和刺激。IBD与症状诸如腹部绞痛和疼痛、腹泻、直肠出血、发热和白细胞计数升高相关。将本文提供的抗CD3抗体剂施用于患有IBD、已经诊断患有IBD或易患IBD的主体。本文提供的抗CD3抗体剂以足以在主体中减轻IBD的至少一种症状,治疗IBD,预防IBD和/或防止IBD进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0159] 在另一个实施方案中,本文提供的抗CD3抗体剂用于治疗、诊断和/或预防溃疡性结肠炎。溃疡性结肠炎是结肠的慢性炎症和刺激。溃疡性结肠炎与症状诸如贫血、疲劳、体重减轻、食欲不振、直肠出血、体液和营养物质的流失、皮肤损害、关节疼痛和生长异常(特别是在儿童中)相关。将本文提供的抗CD3抗体剂施用于患有溃疡性结肠炎、已经诊断患有溃疡性结肠炎或易患溃疡性结肠炎的主体。本文提供的抗CD3抗体剂以足以在主体中减轻溃疡性结肠炎的至少一种症状,治疗溃疡性结肠炎,预防溃疡性结肠炎和/或防止溃疡性结肠炎进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0160] 在另一个实施方案中,本文提供的抗CD3抗体剂用于治疗、诊断和/或预防克罗恩病。克罗恩病是肠的慢性炎症和刺激。克罗恩病与症状诸如腹痛、腹泻、体重减轻、食欲不振、发烧、盗汗、直肠疼痛和直肠出血相关。将本文提供的抗CD3抗体剂施用于患有克罗恩病、已经诊断患有克罗恩病或易患克罗恩病的主体。本文提供的抗CD3抗体剂以足以在主体中减轻克罗恩病的至少一种症状,治疗克罗恩病,预防克罗恩病和/或防止克罗恩病进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0161] 在另一个实施方案中,本文提供的抗CD3抗体剂用于治疗、诊断和/或预防多发性硬化症(MS)。MS是影响中枢神经系统(CNS)的慢性炎症性疾病。MS的症状包括例如感觉变化、视力问题、肌无力、抑郁、协调性和言语困难以及疼痛。将本文提供的抗CD3抗体剂施用于患有MS、已经诊断患有MS或易患MS的主体。本文提供的抗CD3抗体剂以足以在主体中

减轻MS的至少一种症状,治疗MS,预防MS和/或防止MS进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0162] 在另一个实施方案中,本文提供的抗CD3抗体制剂用于治疗、诊断和/或预防狼疮。狼疮是一种慢性炎症性疾病,所述疾病当你身体的免疫系统攻击你自身组织和器官时发生。狼疮引起的炎症会影响许多不同的身体系统 - 包括你的关节、皮肤、肾脏、血细胞、脑、心脏和肺。你经历的狼疮的体征和症状将取决于哪些身体系统受到该疾病的影响。最常见的体征和症状包括:疲劳和发烧、关节疼痛、僵硬和肿胀、覆盖脸颊的面部和鼻梁的蝴蝶状皮疹、随阳光暴露出现或恶化的皮肤损害(光敏性)、暴露于寒冷时或紧张时期过程中手指和脚趾变白或变蓝(雷诺现象)、呼吸急促、胸痛、眼睛干涩、头痛、混乱和失忆。将本文提供的抗CD3抗体制剂施用于患有狼疮、已经诊断患有狼疮或易患狼疮的主体。本文提供的抗CD3抗体制剂以足以在主体中减轻狼疮的至少一种症状,治疗狼疮,预防狼疮和/或防止狼疮进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0163] 在另一个实施方案中,本文提供的抗CD3抗体制剂用于治疗、诊断和/或预防实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)。EAE是影响中枢神经系统(CNS)的慢性炎症性疾病。本文提供的抗CD3抗体制剂以足以在主体中减轻EAE的至少一种症状,治疗EAE,预防EAE和/或防止EAE进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0164] 在另一个实施方案中,本文提供的抗CD3抗体制剂用于治疗、诊断和/或预防胰岛素依赖性糖尿病(I型糖尿病)。I型糖尿病是特征在于激素胰岛素分泌不足导致的持续性高血糖症(高血糖水平)的疾病。I型糖尿病的特征在于胰腺的朗格汉斯胰岛的产生胰岛素的β细胞的丧失。I型糖尿病是自身免疫病,其中身体自身的免疫系统攻击胰腺的朗格汉斯胰岛中的β细胞,破坏它们或对其进行充分损伤以减少或消除胰岛素的产生。I型糖尿病的症状包括例如口渴增加、排尿增加、食欲增加但体重减轻、恶心、呕吐、腹痛和疲劳。将本文提供的抗CD3抗体制剂施用于患有I型糖尿病、已经诊断患有I型糖尿病或易患I型糖尿病的主体。本文提供的抗CD3抗体制剂以足以在主体中减轻I型糖尿病的至少一种症状,治疗I型糖尿病,预防I型糖尿病和/或防止I型糖尿病进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0165] 在另一个实施方案中,本文提供的抗CD3抗体制剂用于治疗、诊断和/或预防II型糖尿病。II型糖尿病是作为长期代谢紊乱的疾病,其特征不在于高血糖、胰岛素抵抗和相对缺乏胰岛素。常见症状包括口渴增加、尿频和不明原因的体重减轻。症状还可能包括饥饿感增加、感觉疲倦以及不愈合的溃疡。通常症状缓慢发作。高血糖引起的长期并发症包括心脏病、中风、可导致失明的糖尿病视网膜病变、肾衰竭和可导致截肢的四肢血流不畅。可能发生高渗性高血糖状态的突然发作;然而,酮酸中毒并不常见。将本文提供的抗CD3抗体制剂施用于患有II型糖尿病、已经诊断患有II型糖尿病或易患II型糖尿病的主体。本文提供的抗CD3抗体制剂以足以在主体中减轻II型糖尿病的至少一种症状,治疗II型糖尿病,预防II型糖尿病和/或防止II型糖尿病进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0166] 在另一个实施方案中,本文提供的抗CD3抗体制剂用于治疗、诊断和/或预防类风湿性关节炎(RA)。类风湿性关节炎是引起关节慢性炎症的自身免疫病。类风湿性关节炎还可引起关节周围组织以及体内其他器官的炎症。RA与症状诸如疲劳、食欲不振、低烧、肌肉和关节疼痛以及僵硬相关。将本文提供的抗CD3抗体制剂施用于患有RA、已经诊断患有RA或易患RA的主体。本文提供的抗CD3抗体制剂以足以在主体中减轻RA的至少一种症状,治疗RA,预防RA和/或防止RA进展至进一步疾病状态的剂量施用。

[0167] 本发明还提供了治疗或减轻与免疫相关病症相关的症状或与器官移植后排斥相关的症状的方法。例如,将本文使用的制剂用于治疗或减轻本文提供的任何自身免疫病和炎性疾病的症状。

[0168] 本文使用的治疗性制剂还用作器官或组织移植中的免疫抑制剂。如本文所用,“免疫抑制剂”是指其对免疫系统的作用导致免疫应答中涉及的至少一种途径的活性立即或延迟降低的药剂,而无论该应答是天然发生还是人工触发,无论该应答作为先天免疫系统、适应性免疫系统或两者的一部分发生。在器官或组织移植之前、期间和/或之后,将这些免疫抑制性抗CD3抗体制剂施用于主体。例如,本文提供的抗CD3抗体制剂用于治疗或预防器官或组织移植后的排斥。

[0169] 在本文使用的仍另一个实施方案中,在检测到人个体内存在自身反应性抗体后,将抗CD3抗体制剂施用于人个体。此类自身反应性抗体在本领域中已知为对人个体中内源性表达的一种或多种蛋白具有结合亲和力的抗体。在本文使用的一个方面,测试人个体特异性参与一种或多种自身免疫病的自身反应性抗体的存在,如本领域所熟知的。在一个具体实施方案中,测试人患者针对胰岛素、谷氨酸脱羧酶和/或IA-2蛋白的抗体的存在,并且随后在阳性检测到一种或多种这样的自身反应性抗体后施用抗CD3抗体。

[0170] 在本文使用的仍另一个实施方案中,将抗CD3制剂施用于人个体以活化粘膜免疫和免疫调节。

[0171] 将抗CD3抗体制剂用于活化调节性T细胞(Tregs)。

[0172] 在本文使用的另一个实施方案中,将抗CD3抗体组合物施用于人主体以预防、降低或减少免疫细胞向人组织中的募集。将本文使用的抗CD3抗体施用于有其需要的主体,以预防和治疗与异常或失调的免疫细胞募集到人疾病的组织部位相关的病况。

[0173] 在本文使用的另一个实施方案中,将抗CD3抗体组合物施用于人主体以预防、降低或减少免疫细胞向人组织中的外渗和渗出。因此,施用本文使用的抗CD3抗体以预防和/或治疗与异常或失调的免疫细胞浸润到人疾病的组织部位相关的病况。

[0174] 在本文使用的另一个实施方案中,将抗CD3抗体组合物施用于人主体以预防、降低或减少人体内由细胞因子释放介导的作用。术语“细胞因子”是指本领域已知的结合细胞表面上的细胞外受体且从而调节细胞功能的所有人细胞因子,包括但不限于IL-2、IFN-g、TNF-a、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。

[0175] 在本文使用的另一个实施方案中,将抗CD3抗体组合物施用于人主体以预防、降低或减少人体内由细胞因子受体释放介导的作用。术语“细胞因子受体”是指本领域内结合一种或多种细胞因子的所有的人细胞因子受体,其如本文所定义,包括但不限于上述细胞因子的受体。因此,施用本文使用的抗CD3抗体以治疗和/或预防通过人体内一种或多种细胞因子受体的异常活化、结合或连接介导的病况。进一步设想在体内施用抗CD3抗体将耗尽该人主体内由细胞因子受体介导的细胞内信号传导。

[0176] 在本文使用的一个方面,在降低其中的胰腺β-细胞功能后,将抗CD3抗体组合物施用于人个体。在一个实施方案中,如本领域已知的,测试个体的β细胞功能、胰岛素分泌或c-肽水平。随后,在注意到指示物的充分减少时,向人个体施用足够的抗CD3抗体剂量方案,以防止其中β细胞功能的自身免疫性破坏的进一步发展。

[0177] 优选地,将本文提供的治疗性抗CD3抗体制剂口服、皮下或经鼻施用于主体。考虑

了其他施用途径。例如，抗CD3抗体制剂以静脉内、肌内或这些施用途径的任何组合进行施用。

[0178] 组合疗法

抗CD3抗体制剂在治疗期间和/或之后与一种或多种另外的药剂(诸如例如化学治疗剂、抗炎剂和/或免疫抑制剂)组合施用。

[0179] 在一些实施方案中，将抗CD3抗体制剂和另外的药剂配制成单一治疗组合物，并同时施用抗CD3抗体制剂和另外的药剂。

[0180] 可选地，抗CD3抗体制剂和另外的药剂彼此分开，例如，将每种配制成单独的治疗组合物，并同时施用抗CD3抗体制剂和另外的药剂，或者抗CD3抗体制剂和另外的药剂在治疗期间的时间不同施用。例如，在施用另外的药剂之前施用抗CD3抗体制剂，在施用另外的药剂之后施用抗CD3抗体制剂，或以交替的方式施用抗CD3抗体制剂和另外的药剂。如本文所述，抗CD3抗体制剂和另外的药剂以单剂量或多剂量施用。

[0181] 在一些实施方案中，同时施用抗CD3抗体制剂和另外的药剂。例如，抗CD3抗体制剂和另外的药剂可以配制成单一组合物或作为两种或多种单独的组合物施用。在一些实施方案中，依次施用抗CD3抗体制剂和另外的药剂，或者在治疗期间的时间不同施用抗CD3抗体制剂和另外的药剂。

[0182] 如果实现各种实验室或临床目标的任一种，则认为将抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合施用于患有自身免疫病、炎症疾病、神经退行性疾病或癌症的患者是成功的。例如，如果与疾病或病症相关的一种或多种症状减轻、降低、抑制或未进展至进一步(即更坏的)状态，则认为向患有自身免疫病、炎症疾病、神经退行性疾病或癌症的患者单独或与一种或多种另外的药剂组合施用抗CD3抗体制剂是成功的。如果疾病或病症进入缓解期或未进展至进一步(即更坏的)状态，则认为向患有自身免疫病、炎症疾病、神经退行性疾病或癌症的患者单独或与一种或多种另外的药剂组合施用抗CD3抗体制剂是成功的。

[0183] 适合与本发明的组合物和方法使用的第二药剂包括例如NF- κ B抑制剂、GLP-1或 β 细胞静息化合物、美沙拉嗪或另一种5-ASA药物、己酮可可碱、熊去氧胆酸、PPAR γ 激动剂、全反式维甲酸(ATRA)、DPP-4(格列汀类-西他列汀)、脂肪酸合成抑制剂(如浅蓝菌素、槲皮素、C7、芹菜素、AICAR)、FXR激动剂(如胆汁盐活化剂、鹅去氧胆酸、奥贝胆酸(OIBA、Ocaliva)、fexaramine、咖啡醇、胆汁酸螯合剂(消胆胺、降胆宁、coleserlam)、SGLT2抑制剂(前达格列净(ex- dapagliflozin)(降低HbA1c水平)、抗IL-6RmAb、抗TNF抗体(Remicade[®](英利昔单抗)和Humira[®](阿达木单抗)、Enbrel[®](依那西普)抗炎和/或免疫抑制化合物(如甲氨蝶呤、环孢菌素A环孢菌素微乳)、他克莫司、皮质类固醇、他汀类药物、干扰素 β 、醋酸格拉替雷(Copaxone)、干扰素 β -1a(Avonex)、干扰素 β -1a(Rebif)、干扰素 β -1b(Betaseron或Betaferon)、米托蒽醌(Novantrone)、地塞米松(Decadron)、甲基强的松龙(Depo-Medrol)、强的松(Deltasone)或抗肥胖药物。

[0184] 在一些实施方案中，包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法用于治疗溃疡性结肠炎。在一些实施方案中，在施用抗CD3抗体制剂之前抑制与溃疡性结肠炎相关的潜在胃炎症。在一些实施方案中，在施用另外的治疗剂之前抑制与溃疡性结肠炎相关的潜在胃炎症。在一些实施方案中，在施用抗CD3抗体制剂和另外的治疗剂之前抑制与溃疡性结

肠炎相关的潜在胃炎症。在一些实施方案中,将待治疗的主体用抗炎剂预处理,所述抗炎剂在用抗CD3抗体制剂治疗之前给药。在一些实施方案中,将待治疗的主体用抗炎剂预处理,所述抗炎剂在用另外的药剂治疗之前给药。在一些实施方案中,将待治疗的主体用抗炎剂预处理,所述抗炎剂在用抗CD3抗体制剂和另外的药剂治疗之前给药。

[0185] 在一些实施方案中,第二药剂是抗白细胞介素6R (IL-6R) 药剂,诸如例如抗IL-6R抗体或其片段。在一些实施方案中,第二药剂是一种或多种抗炎剂。在一些实施方案中,第二药剂是NF- κ B抑制剂。

[0186] 在一些实施方案中,第二药剂是全反式维甲酸 (ATRA)。ATRA在肠中以高水平产生,并且其在粘膜免疫和免疫耐受中起重要作用。基础水平的RA是免疫细胞存活和活化所必需的。还已知ATRA有助于调节性T细胞 (Treg) 分化。

[0187] 在一些实施方案中,第二药剂是美沙拉嗪或另一种5-ASA药物。在一些实施方案中,在整个治疗方案中每天一次施用包含抗CD3抗体制剂和美沙拉嗪或另一种5-ASA药物的组合疗法。

[0188] 在一些实施方案中,第二药剂是抗肿瘤坏死因子 (TNF) 抗体。任何合适的抗TNF抗体或其抗原结合片段可用于包括本公开的抗CD3抗体制剂的组合疗法,包括但不限于 Remicade[®] 和 Humira[®]。

[0189] 在一些实施方案中,第二药剂是GLP-1或 β 细胞静息化合物(即减少或以其他方式抑制胰岛素释放的化合物,例如钾通道开放剂)。合适的GLP-1化合物的实例描述于例如公开的申请U.S. 20040037826中,且合适的 β 细胞静息化合物描述于公开的申请U.S. 20030235583中,其各自以其整体通过引用并入本文。

[0190] 在另一个实施方案中,用于治疗免疫相关病症的抗CD3抗体制剂与多种已知的抗炎和/或免疫抑制化合物的任何联合施用。合适的已知化合物包括但不限于甲氨蝶呤、环孢菌素A(包括例如环孢菌素微乳)、他克莫司、皮质类固醇、他汀类药物、干扰素 β 、Remicade (英夫利昔单抗)、Enbrel (依那西普) 和 Humira (阿达木单抗)。

[0191] 例如,在类风湿性关节炎的治疗中,本文使用的抗CD3抗体制剂可与皮质类固醇、甲氨蝶呤、环孢菌素A、他汀类药物、抗IL-6R抗体、Remicade (英夫利昔单抗)、Enbrel (依那西普) 和/或 Humira (阿达木单抗) 共同施用。

[0192] 在葡萄膜炎的治疗中,抗CD3抗体制剂可以与例如皮质类固醇、甲氨蝶呤、环孢菌素A、环磷酰胺和/或他汀类药物联合施用。同样地,患有疾病诸如克罗恩病或银屑病的患者可以用本文使用的抗CD3抗体组合物和 Remicade (英夫利昔单抗)、抗IL-6R抗体和/或 Humira (阿达木单抗) 的组合进行治疗。

[0193] 患有多样性硬化症的患者可以接受本文使用的抗CD3抗体组合物与以下的组合:例如,醋酸格拉替雷 (Copaxone)、干扰素 β -1a (Avonex)、干扰素 β -1a (Rebif)、干扰素 β -1b (Betaseron或Betaferon)、米托蒽醌 (Novantrone)、抗IL-6R抗体、地塞米松 (Decadron)、甲基强的松龙 (Depo-Medrol) 和/或强的松 (Deltasone) 和/或他汀类药物。

[0194] 在一个实施方案中,如上所述,本文使用的免疫抑制性抗CD3抗体制剂与第二药剂(例如GLP-1或 β 细胞静息化合物)联合施用。

[0195] 在另一个实施方案中,这些免疫抑制性抗CD3抗体制剂与多种已知的抗炎和/或免疫抑制化合物的任何联合施用。与本文所用抗CD3抗体使用的合适的抗炎和/或免疫抑制化

合物包括但不限于甲氨蝶呤、环孢菌素A(包括,例如,环孢菌素微乳)、他克莫司、皮质类固醇和他汀类药物。

[0196] 在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图34中所示的给药方案施用。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图34中所示的给药方案施用,并且重复给药方案。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图34中所示的给药方案施用,并且在药物假期周期后重复给药方案。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图34中所示的给药方案施用,并且重复药物假期周期。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图34中所示的给药方案施用,并且重复给药方案和药物假期周期。在一些上述实施方案中,第二药剂选自ATRA、美沙拉嗪或其他5-ASA药物、和抗TNF抗体或其抗原结合片段。

[0197] 在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法用于治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。NASH是一种自身免疫病,其由于脂肪沉积过多而与严重的潜在肝纤维化相关。天然胆汁酸(鹅去氧胆酸)是法尼醇X受体(FXR)最活跃的生理配体,其参与许多生理和病理过程。奥贝胆酸(Obeticholic acid)是第一种用于人药物研究的FXR激动剂。然而,OBA的治疗效用可能限于患者的子集。OBA不抑制自身免疫病。因此,当组合施用,FXR激动剂与本公开的抗CD3抗体制剂的组合产生协同效应。

[0198] 在一些实施方案中,第二药剂是二甲双胍。在一些实施方案中,第二药剂是二甲双胍,其以约500mg BID的剂量施用,持续44周治疗。

[0199] 在一些实施方案中,第二药剂是己酮可可碱。在一些实施方案中,第二药剂是己酮可可碱,其以约400 mg 3X/天或约600 mg BID的剂量施用,持续52周治疗。

[0200] 在一些实施方案中,第二药剂是熊去氧胆酸。在一些实施方案中,第二药剂是熊去氧胆酸,其以约10 mg/kg/天至约20 mg/kg/天的剂量施用,持续52周治疗。

[0201] 在一些实施方案中,第二药剂是奥贝胆酸。在一些实施方案中,第二药剂是奥贝胆酸,其以约10 mg/kg/天至约20 mg/kg/天的剂量施用,持续52周治疗。

[0202] 在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图35中所示的给药方案施用。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图35中所示的给药方案施用,并且重复给药方案。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图35中所示的给药方案施用,并且重复药物假期周期。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图35中所示的给药方案施用,并且重复给药方案和药物假期周期。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图35中所示的给药方案施用,并且以以下时间表重复给药方案:5-7天给药,21-28天停药。在一些上述实施方案中,第二药剂选自二甲双胍、己酮可可碱(pentoxifyllin)、熊去氧胆酸、奥贝胆酸及其组合。在一些上述实施方案中,第二药剂是二甲双胍,其以500mg BID施用,持续44周治疗。在一些上述实施方案中,第二药剂是己酮可可碱,其以400mg 3X/天或600mg BID的剂量施用,持续52周治疗。在一些上述实施方案中,第二药剂是熊去氧胆酸,其以10-20mg/kg/天的剂量施用,持续52周治疗。在一些上述实施方案中,第二药剂是奥贝胆酸,其以10-20mg/kg/天的剂量施用,持续52周治疗。

[0203] 在一些实施方案中,将包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法用于治

疗I型糖尿病。在一些实施方案中,第二药剂是可用于治疗I型糖尿病和/或II型糖尿病的任何本领域公认的药剂。在一些实施方案中,第二药剂是二甲双胍。在一些实施方案中,第二药剂是二甲双胍,并且抗CD3抗体制剂是口服制剂。在一些实施方案中,第二药剂是二甲双胍,并且抗CD3抗体制剂是口服胶囊制剂。在一些实施方案中,二甲双胍以约500mg BID的剂量施用。在一些实施方案中,二甲双胍以约500mg BID的剂量施用,并且抗CD3制剂的施用量使得组合疗法降低主体中的胰岛素依赖性。在一些实施方案中,二甲双胍以约500mg BID的剂量施用,并且将抗CD3制剂施用于特定患者群体。在一些实施方案中,二甲双胍以约500mg BID的剂量施用,并且抗CD3制剂施用于具有c-肽血清水平在约0.1nmol/L至约0.4nmol/L范围内,HbA1c水平小于7%和/或胰岛素依赖性在约0.25U/kg/天的范围内的患者。

[0204] 在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图36中所示的给药方案施用。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图36中所示的给药方案施用,并且重复给药方案。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图36中所示的给药方案施用,并且重复药物假期周期。在一些实施方案中,包含抗CD3抗体制剂和至少第二治疗剂的组合疗法以图36中所示的给药方案施用,并且重复给药方案和药物假期周期。在一些上述实施方案中,药物假期周期是基于c-肽的血清水平的提高和/或HbA1c从基线的降低。在一些上述实施方案中,第二药剂是二甲双胍。

[0205] 本公开还提供了在各种治疗适应症中单独或与至少一种另外的药剂组合使用抗CD3抗体制剂的方法。在一些实施方案中,抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合可用于治疗自身免疫病和/或炎性疾病。

[0206] 在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗自身免疫病和/或炎性疾病的方法中。在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗炎性肠病(IBD)的方法中。在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗移植物抗宿主病(GvHD)的方法中。在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗NASH的方法中。在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗I型糖尿病的方法中。

[0207] 在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗原发性胆汁性肝硬化(PBC)的方法中。在一些实施方案中,口服抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的方法中。

[0208] 在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗自身免疫病和/或炎性疾病的方法中。在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗IBD的方法中。在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗GvHD的方法中。在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于治疗I型糖尿病的方法中。

[0209] 在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂单独或与一种或多种另外的药剂组合用于抑制主体中移植的生物材料的排斥和/或延长移植的生物材料的存活的方法中。待移植的生物材料是一种或多种细胞或细胞类型、一种或多种组织或组织类型或器官或其部分。

例如,待移植的生物材料是同种异体生物材料。在一些实施方案中,待移植的生物材料是胰岛细胞。在一些实施方案中,胰岛细胞是同种异体胰岛细胞。在一些实施方案中,待移植的生物材料是肾脏、胰腺、肝脏或肠或源自肾脏、胰腺、肝脏或肠。例如,在一些实施方案中,待移植的生物材料是或源自一种或多种肾细胞。在一些实施方案中,在移植期间和/或之后施用皮下抗CD3抗体制剂。在一些实施方案中,皮下抗CD3抗体制剂在移植期间和/或之后与一种或多种另外的药剂组合施用。在一些实施方案中,同时施用皮下抗CD3抗体制剂和另外的药剂。例如,皮下抗CD3抗体制剂和另外的药剂可以配制成单一组合物或作为两种或多种单独的组合物施用。在一些实施方案中,依次施用皮下抗CD3抗体制剂和另外的药剂。

[0210] 预防性施用

将本文提供的抗CD3抗体制剂(在本文中也称为抗体组合物)用于诊断和预防性制剂中。在一个实施方案中,将本文提供的抗CD3抗体制剂施用于处于发生上述自身免疫病之一的风险中的患者。可以使用基因型、血清学或生物化学标志物确定患者对一种或多种上述自身免疫病的易感性。例如,特定HLA亚型和血清学自身抗体(针对胰岛素、GAD65和IA-2)的存在指示I型糖尿病。

[0211] 在本文提供的另一个实施方案中,将抗CD3抗体制剂施用于诊断患有的一种或多种上述自身免疫病的人个体。诊断后,施用抗CD3抗体以减缓或逆转自身免疫的影响。在一个这样的实例中,向诊断患有I型糖尿病的人个体施用足够剂量的抗CD3抗体以恢复胰腺功能并最小化自身免疫浸润到胰腺中的损害。在另一个实施方案中,向诊断患有类风湿性关节炎的人个体施用抗CD3抗体以减少免疫细胞浸润和破坏肢体关节。

[0212] 优选地,将本文提供的治疗性、诊断和/或预防性抗CD3抗体制剂静脉内或皮下施用于主体。考虑了其他施用途径。例如,将抗CD3抗体制剂以静脉内、皮下、口服、肠胃外、经鼻、肌内或这些施用途径的任何组合进行施用。

[0213] 本发明的其他方面

在另一方面,本公开提供通过亲和层析、离子交换层析和/或羟基磷灰石层析纯化抗CD3抗体的方法。例如,亲和层析是蛋白A层析。离子交换层析例如是阴离子交换层析。

[0214] 在进一步的方面,本发明提供了本领域已知的治疗性抗体的口服制剂。制剂是液体或冻干粉末。

[0215] 冻干制剂包含单位剂量的抗体或其抗原结合片段和每mg抗体或其抗原结合片段约34mg海藻糖和0.17mg甲硫氨酸。

[0216] 液体制剂包含单位剂量的抗体或其抗原结合片段、20%海藻糖(w/v)和0.1%甲硫氨酸(w/v)。

[0217] 这些口服制剂可以呈胶囊形式,优选肠溶包衣胶囊。

[0218] 定义

除非另有定义,否则与本发明结合的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,单数术语应当包括复数,并且复数术语应当包括单数。一般地,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白和寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交结合利用的命名法及其技术是本领域众所周知和常用的那些。标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如电穿孔、脂转染)。根据制造商的说明或如本领域通常所完成或如本文所述,进行酶促反应和纯化技术。通常根据本领域众所周

知且如本说明书通篇引用和讨论的各种通用和更具体参考文献中所述的常规方法,进行前述技术和程序。参见例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))。与本文所述的分析化学、合成有机化学以及药物和药物化学结合利用的命名法及其实验室程序和技术是本领域众所周知和通常使用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送以及患者的治疗。

[0219] 除非另有指明,如按照本公开所用的以下术语应当理解为具有以下含义:

如本文所用,术语“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫学活性部分,即包含特异性结合抗原(与之发生免疫反应)的抗原结合位点的分子。此类抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、单链、 F_{ab} 、 F_{ab}' 和 $F_{(ab)2}$ 片段以及 F_{ab} 表达文库。“特异性结合”或“与之发生免疫反应”意指抗体与期望抗原的一个或更多个抗原决定簇反应,并且不与其他多肽反应(即结合)或以低得多的亲和力($K_d > 10^{-6}$)结合其他多肽。

[0220] 已知基本抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体由相同的两对多肽链构成,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括约100至110或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。每条链的羧基末端部分定义主要负责效应子功能的恒定区。人轻链分类为 κ 和 λ 轻链。重链分类为 μ 、 Δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,且重链还包含约10个或更多个氨基酸的“D”区。一般参见 *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., 等人, 第2版 Raven Press, N.Y. (1989))。每条轻链/重链对的可变区形成了抗体结合位点。

[0221] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”(MAb)或“单克隆抗体组合物”指仅含有一个分子种类的抗体分子的抗体分子群体,所述抗体分子由独特的轻链基因产物和独特的重链基因产物组成。特别地,单克隆抗体的互补决定区(CDR)在群体的所有分子中都是相同的。MAb含有能够与抗原的特定表位免疫反应的抗原结合位点,其特征在于对于其独特的结合亲和力。

[0222] 一般而言,从人获得的抗体分子涉及类别IgG、IgM、IgA、IgE和IgD中的任一种,其通过分子中存在的重链的性质而彼此不同。某些类别还具有亚类,如IgG₁、IgG₂及其他。此外,在人中,轻链可以是 κ 链或 λ 链。

[0223] 如本文使用的,术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白、scFv或T细胞受体的任何蛋白决定簇。术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白或T细胞受体的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面分组例如氨基酸或糖侧链组成,并且通常具有特异性三维结构特征以及特异性电荷特征。当解离常数 $\leq 1 \mu\text{M}$,优选地 $\leq 100 \text{ nM}$,且最优选 $\leq 10 \text{ nM}$ 时,将抗体称为特异性结合抗原。

[0224] 如本文使用的,术语“免疫结合”和“免疫结合特性”和“特异性结合”指在免疫球蛋白分子和免疫球蛋白对于其特异性的抗原之间发生的非共价相互作用类型。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以依据相互作用的解离常数(K_d)来表示,其中较小的 K_d 代表较大的亲和力。使用本领域众所周知的方法来定量所选多肽的免疫结合特性。一种这样的方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中这些速率取决于复合配偶体的浓度、相互作用的亲和力以及在两个方向上同等影响速率的几何参数。因此,“结合速率常

数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})两者均可以通过计算结合和解离的浓度和实际速率来测定。(参见Nature 361:186-87 (1993))。K_{off}/K_{on}的比率使得能够消除与亲和力无关的所有参数,并且等于解离常数K_d。(一般参见Davies等人(1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。当如通过测定例如放射性配体结合测定或本领域技术人员已知的类似测定测量的,平衡结合常数(K_d)为≤1 μM,优选≤100 nM,更优选≤10 nM,且最优选≤100 pM至约1 pM时,将本发明的抗体称为特异性结合CD3表位。

[0225] 保守氨基酸取代指具有相似侧链的残基的可互换性。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;和具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0226] 如本文所讨论的,抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列中的微小变化被视为由本发明包含,条件是氨基酸序列中的变化维持至少75%,更优选至少80%、90%、95%,且最优选99%。特别地,考虑了保守的氨基酸替代。保守取代是发生在其侧链相关的氨基酸家族内的那些取代。遗传编码的氨基酸一般分成下述家族:(1)酸性氨基酸是天冬氨酸、谷氨酸;(2)碱性氨基酸是赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性氨基酸是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、和(4)不带电荷的极性氨基酸是甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水性氨基酸包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸。疏水性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。其他家族的氨基酸包括(i)丝氨酸和苏氨酸,它们是脂肪族-羟基家族;(ii)天冬酰胺和谷氨酰胺,它们是含酰胺的家族;(iii)丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,它们是脂肪族;和(iv)苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,它们是芳香族。

[0227] 术语“药剂”在本文用于指化合物、化合物的混合物、生物大分子或由生物学材料制成的提取物。

[0228] 术语患者包括人和兽医主体。

[0229] 本公开还包括F_v、F_{ab}、F_{ab}和F_{(ab)₂}抗CD3抗体片段,单链抗CD3抗体,双特异性抗CD3抗体,异源缀合抗CD3抗体,三特异性抗体,免疫缀合物及其片段。

[0230] 双特异性抗体是对至少两种不同抗原具有结合特异性的抗体。在本案中,结合特异性之一是针对CD3。所述第二结合靶是任何其它抗原,并且有利地是细胞表面蛋白或受体或受体亚基。

[0231] 本文引用的所有出版物和专利文件通过引用并入本文,如同每一此类出版物或文件被明确且单独地指明通过引用并入本文。出版物和专利文件的引用并非意欲承认任何是相关现有技术,也不意欲构成对其内容或日期的任何承认。现在已经通过书面说明描述了本公开,本领域技术人员将认识到,本公开可以在各种实施方案中实践,并且前面的描述和下文的实施例是出于说明的目的而非限制随后的权利要求。

具体实施方式

[0232] 本发明还涉及以下实施方案：

1. 制剂，其包含：抗CD3抗体或其抗原结合片段、三水乙酸钠、氯化钠、聚山梨酯80、海藻糖和甲硫氨酸。

[0233] 2. 实施方案1的液体制剂，其还包含EDTA。

[0234] 3. 实施方案1或2的制剂，其中所述制剂是液体。

[0235] 4. 实施方案1或2的制剂，其中所述制剂是冻干粉末。

[0236] 5. 前述实施方案中任一项的制剂，其包含单位剂量的抗CD3抗体或抗原结合片段。

[0237] 6. 实施方案5的制剂，其中所述单位剂量为约0.1 mg至10 mg。

[0238] 7. 实施方案6的制剂，其中所述单位剂量为0.5 mg、2.5 mg或5.0 mg。

[0239] 8. 实施方案3的制剂，其中：

- a. 三水乙酸钠的浓度为约10 mM至500 mM；
- b. 氯化钠的浓度为约10 mM至500 mM；
- c. 聚山梨酯80的浓度为约0.01%至1% (w/v)；
- d. 海藻糖的浓度为约5%至50% (w/v)；和
- e. 甲硫氨酸的浓度为0.01%至1% (w/v)。

[0240] 9. 实施方案8的制剂，其中EDTA的浓度为约0.01%至1% (w/v)。

[0241] 10. 实施方案8的制剂，其中所述溶液的pH范围为4-6。

[0242] 11. 实施方案8、9或10的制剂的冻干粉末。

[0243] 12. 液体制剂，其包含单位剂量的约0.1 mg至10 mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段、25 mM三水乙酸钠、125 mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v) 和0.1%甲硫氨酸(w/v)。

[0244] 13. 实施方案11的制剂，其还包含0.1% EDTA (w/v)。

[0245] 14. 实施方案12或13的液体制剂，其中所述单位剂量为0.5 mg、2.5 mg或5.0 mg。

[0246] 15. 实施方案12、13或14的制剂的冻干粉末。

[0247] 16. 实施方案4的制剂，其中：

a. 所述抗CD3抗体或抗原结合片段与聚山梨酯80的比例为约1: 0.01-0.1 (w/w)；

b. 所述抗CD3抗体或抗原结合片段与海藻糖的比例为约1: 10-50 (w/w)；

c. 所述抗CD3抗体或抗原结合片段与甲硫氨酸的比例为约1: 0.1-0.5 (w/w)；

d. 所述抗CD3抗体或抗原结合片段与三水乙酸钠的比例为约1:0.1-1.0 (w/w)；

和

e. 所述抗CD3抗体或抗原结合片段与氯化钠的比例为约1:0.5-2.0 (w/w)。

[0248] 17. 实施方案16的制剂，其中所述抗CD3抗体或抗原结合片段与EDTA的比例为约1: 0.1-0.5 (w/w)。

[0249] 18. 粉末制剂，其包含单位剂量的约0.1mg至10mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸钠、1.25mg氯化钠、0.034mg聚山梨酯80、34mg海藻糖和0.17mg甲硫氨酸。

[0250] 19. 实施方案18的粉末制剂，其还包含每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段0.17mg

EDTA。

[0251] 20. 实施方案18的粉末制剂,其中所述单位剂量为0.5 mg、2.5 mg或5.0 mg。

[0252] 21. 肠溶包衣的口服胶囊,其包含前述实施方案中任一项的制剂。

[0253] 22. 含有抗CD3抗体冻干制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗CD3抗体冻干制剂包含单位剂量的约0.1mg至10mg的抗CD3抗体或其抗原结合片段和每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段约0.58mg三水乙酸钠、1.25mg氯化钠、0.034mg聚山梨酯80、34mg海藻糖和0.17mg甲硫氨酸。

[0254] 23. 实施方案22的肠溶包衣的口服胶囊,其中所述抗CD3抗体冻干制剂还包含每1mg抗CD3抗体或其抗原结合片段0.17mg EDTA。

[0255] 24. 实施方案22或23的肠溶包衣的口服胶囊,其中所述单位剂量为0.5 mg、2.5 mg或5.0 mg。

[0256] 25. 含有抗CD3抗体液体制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗CD3抗体液体制剂包含单位剂量的约0.1mg至10mg抗CD3抗体或其抗原结合片段、25mM三水乙酸钠、125mM氯化钠、0.02%聚山梨酯80 (w/v)、20%海藻糖 (w/v)和0.1%甲硫氨酸 (w/v)。

[0257] 26. 实施方案25的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗CD3抗体液体制剂还包含0.1% EDTA。

[0258] 27. 实施方案25或26的肠溶包衣的口服胶囊,其中所述单位剂量为0.5 mg、2.5 mg或5.0 mg。

[0259] 28. 前述实施方案中任一项的制剂,其中抗CD3抗体含有:包含氨基酸序列GYGMH (SEQ ID NO: 1)的重链互补决定区1(CDRH1)、包含氨基酸序列VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 3)的重链互补决定区2(CDRH2)、包含氨基酸序列QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 4)的重链互补决定区3(CDRH3)、包含氨基酸序列RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 5)的轻链互补决定区1(CDRL1)、包含氨基酸序列DASNRAT (SEQ ID NO: 6)的轻链互补决定区2(CDRL2)和包含氨基酸序列QQRSNPPLT (SEQ ID NO: 7)的轻链互补决定区3(CDRL3)。

[0260] 29. 前述实施方案中任一项的制剂,其中抗CD3抗体含有包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的可变重链氨基酸序列和包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的可变轻链氨基酸序列。

[0261] 30. 前述实施方案中任一项的制剂,其中抗CD3抗体含有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链氨基酸序列和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链氨基酸序列。

[0262] 31. 前述实施方案中任一项的制剂,其中所述制剂还包含至少一种另外的活性剂,所述活性剂选自:NF-kB抑制剂、GLP-1或 β 细胞静息化合物、美沙拉嗪或另一种5-ASA药物、己酮可可碱、熊去氧胆酸、PPAR γ 激动剂、全反式维甲酸(ATRA)、DPP-4(格列汀类-西他列汀)、脂肪酸合成抑制剂(如浅蓝菌素、槲皮素、C7、芹菜素、AICAR)、FXR激动剂(如胆汁盐活化剂、鹅去氧胆酸、奥贝胆酸(OIBA, Ocaliva)、fexaramine、咖啡醇、胆汁酸螯合剂(消胆胺、降胆宁、coleserelam)、SGLT2抑制剂(前达格列净(降低HbA1c水平)、抗IL-6R mAb、抗TNF抗体(Remicade®(英利昔单抗)和Humira®(阿达木单抗)、Enbrel®(依那西普)抗炎和/或免疫抑制化合物(如甲氨蝶呤、环孢菌素A环孢菌素微乳)、他克莫司、皮质类固醇、他汀类药物、干扰素 β 、醋酸格拉替雷(Copaxone)、干扰素 β -1a(Avonex)、干扰素 β -1a(Rebif)、干扰素 β -1b(Betaseron或Betaferon)、米托蒽醌(Novantrone)、地塞米松(Decadron)、甲基强的松龙(Depo-Medrol)、强的松(Deltasone)和抗肥胖药物。

[0263] 32. 治疗或减轻自身免疫病、炎性疾病、神经退行性疾病或癌症的症状的方法,其包括向有其需要的主体施用实施方案21-27中任一项的肠溶包衣的口服胶囊。

[0264] 33. 实施方案32的方法,其中所述自身免疫病是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、1型糖尿病、2型糖尿病或溃疡性结肠炎(UC)。

[0265] 34. 实施方案32的方法,其还包括向所述主体施用至少一种另外的活性剂,所述活性剂选自:NF- κ B抑制剂、GLP-1或 β 细胞静息化合物、美沙拉嗪或另一种5-ASA药物、己酮可可碱、熊去氧胆酸、PPAR γ 激动剂、全反式维甲酸(ATRA)、DPP-4(格列汀类-西他列汀)、脂肪酸合成抑制剂(如浅蓝菌素、槲皮素、C7、芹菜素、AICAR)、FXR激动剂(如胆汁盐活化剂、鹅去氧胆酸、奥贝胆酸(OIBA, Ocaliva)、fexaramine、咖啡醇、胆汁酸螯合剂(消胆胺、降胆宁、coleserelam)、SGLT2抑制剂(前达格列净(降低HbA1c水平)、抗IL-6R mAb、抗TNF抗体(Remicade®(英利昔单抗)和Humira®(阿达木单抗)、Enbrel®(依那西普)抗炎和/或免疫抑制化合物(如甲氨蝶呤、环孢菌素A环孢菌素微乳)、他克莫司、皮质类固醇、他汀类药物、干扰素 β 、醋酸格拉替雷(Copaxone)、干扰素 β -1a(Avonex)、干扰素 β -1a(Rebif)、干扰素 β -1b(Betaseron或Betaferon)、米托蒽醌(Novantrone)、地塞米松(Decadron)、甲基强的松龙(Depo-Medrol)、强的松(Deltasone)和抗肥胖药物。

[0266] 35. 活化主体中的粘膜免疫和免疫调节的方法,其包括向有其需要的主体口服施用抗CD-3抗体。

[0267] 36. 活化调节性T细胞(Tregs)的方法,其包括向有其需要的主体口服施用抗CD-3抗体。

[0268] 37. 含有抗体液体制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗体液体制剂包含单位剂量的抗体或其抗原结合片段、20%海藻糖(w/v)和0.1%甲硫氨酸(w/v)。

[0269] 38. 含有抗体冻干制剂的肠溶包衣的口服胶囊,所述抗体冻干制剂包含单位剂量的抗体或其抗原结合片段和每mg抗体或其抗原结合片段约34mg海藻糖和0.17mg甲硫氨酸。

[0270] 39. 实施方案25或35的肠溶包衣的口服胶囊,其中所述抗体具有IgG1同种型。

[0271] 实施例1:给药

动物模型数据表明,对于每只小鼠,本公开的口服抗CD3制剂的合适剂量为约15 mcg/小鼠20g体重或约750mcg/kg。基于体表面积的人等效剂量的转换因子是12.3。因此,人等效剂量达到3.67mg/60kg体重。人主体将接受0.1mg至10mg的抗CD3抗体。

[0272] 动物数据已经证明皮下剂量需要是口服抗CD3制剂剂量的至少两倍。因此,本公开的下抗CD3制剂的剂量范围为约1mg/60kg体重至60kg体重的范围。

[0273] 实施例2:生产用于口服制剂的冻干NI-0401/CD3抗体剂型的一般方法

这些研究的目的是开发NI0401的口服剂量制剂。具体而言,该研究的目的是产生NI-0401/CD3抗体的冻干剂型。冻干形式的NI0401将是胶囊中口服制剂的活性成分。

[0274] 通过对填充剂和稳定剂进行赋形剂筛选随后在T0和T14进行稳定性评估来开发冻干制剂。简言之,如概述完成可行性评估

。迭代1:在T0和T14的填充剂筛选和稳定性分析:使用填充剂诸如海藻糖、蔗糖、甘露醇和乳糖。

。迭代2:稳定剂筛选和稳定性分析:使用稳定剂诸如甲硫氨酸、精氨酸、抗坏血酸钠和EDTA与选择的填充剂(来自迭代#1的海藻糖)组合使用。

· 使用MDSC对来自迭代# 2的选择的先导制剂(含有海藻糖作为填充剂以及含有稳定剂甲硫氨酸+/- EDTA)测定玻璃化转变温度(Tg)。

。迭代3:先导制剂的冻干,和在T0和T14(50℃和4℃)下的14天短期稳定性分析。

[0275] 材料与amp;方法

透析

透析通过选择性扩散通过具有已知分子量截止的半透膜促进水性缓冲液与目的蛋白的交换。用于该技术的膜的孔径不同。

[0276] 将在25mM乙酸钠/125mM NaCl/0.02% W/V聚山梨酯中的样品等分试样NI-0401取入Slide - A-Lyzer[®] Dialysis Cassette (3-12 mL,且MW截止10,000)。然后将样品针对0.5升的含有25mM乙酸钠/0.02% W/V聚山梨酯但不含氯化钠的缓冲液透析,用500 mL缓冲液进行前3次缓冲液交换(间隔~1小时)预先平衡至2-8℃,用于从样品中去除氯化钠。从盒中收集经透析的样品,并且使用Nano Drop分光光度计通过UV光谱在没有稀释的情况下评估NI-0401样品的浓度,其基于Tiziana提供的在A280nm处的1mg/mL的理论消光为1.52。

[0277] pH

使用配备有Ross PerpHecT微电极(型号8220BNWP)的Thermo Scientific, Orion Star Model A 211 pH计测量NI-0401制剂样品或安慰剂的pH。对于缓冲溶液制剂,使用三极管电极测量pH(ThermoScientific, US Gel-filled Ultra Triode Electrodes)。在每次使用之前,使用pH 4、7和10缓冲液将仪器标准化。

[0278] A280

对于A280方法验证,使用配备有SoftMAX Pro 6.4的Molecular Dynamics的SpectraMax Plus 384系统通过UV光谱进行评估。将路径长度设定为1cm的标准石英比色皿(Starna Cells)用于A280分析。96孔石英板的所有孔用200μl水填充,并使用标准水检查在280nm、252和330读取。将1X PBS缓冲液用于所有稀释液并作为空白缓冲液。使用1X PBS将5.9mg/mL的NI-0401储备溶液稀释为1.2mg/mL至1.5mL管中。该储备溶液用于制备1.0、0.8、0.6、0.4、0.2和0.1mg/mL的以下稀释液。所有稀释液在分开的微量离心管中制备并涡旋混合几秒钟。每次稀释进行一式三份进行,除了1.0mg/mL之外,其进行一式六份。样品分析的目标浓度选择为1mg/mL。六次重复的稀释液将在100%目标浓度下获得批内精密度(intra-precision)和批间精密度(inter-precision)。将标准稀释液转移至96孔石英板,每孔200μl。具有稀释液的板在波长280nm和330nm下运行。从A280中减去330nm处的背景,并然后分析值的线性、精密度和准确度。

[0279] SDS-PAGE

NI-0401纯度/稳定性使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在还原和非还原条件下测定。在4-12% Bis-Tris凝胶上分析样品。在β巯基乙醇存在下将用于还原分析的样品还原,并在4-12% Bis-Tris凝胶上分离。通过运行具有三种不同上样量的三块凝胶来验证方法,以建立估计蛋白纯度中的精密度和线性。通过使用GS800密度计Quantity One Software测定每块凝胶的线性。

[0280] SEC-HPLC

在连续三天内验证尺寸排阻高效液相色谱(SE-HPLC)方法的线性、准确度和精密度。Tiziana提供~6.5 mg/mL (6.0+/-0.6mg/mL)的NI-0401样品,其用作方法验证的标准。

[0281] MDSC

MDSC用于测定和比较先导(液体)制剂的玻璃化转变(T_g)温度。MDSC测量样品和惰性参考之间的热流差异,因为它们都经受同时线性和正弦温度程序。使用差示扫描量热法进行过程中样品的热行为。

[0282] 对于MDSC研究,将未透析/透析的NI-0401蛋白样品等分至每瓶2.5mg。将30 μ L液体制剂装入T Zero盘(pans)中并用T Zero密封盖封闭(crimped)。用TZero密封盖封闭的空TZero盘用作参考。通过将30 μ L先导制剂置于Tzero盘中并进行气密密封来检查样品。将空盘用作参考。使用下面列出的方法参数评估玻璃化转变温度(T_g)和共晶温度(T_{eu})。

[0283] 用于确定NI0401的 T_g 和 T_{eu} 的MDSC方法参数

每60秒调节 $\pm 1^\circ\text{C}$

等温5分钟

以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 渐变至 -60°C

标记周期1的结束

等温5分钟

以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 渐变至 25°C

标记周期1的结束

用于测定对NI-0401的 T_g 的退火影响的MDSC方法参数

在 25°C 平衡

每60秒调节 $\pm 1^\circ\text{C}$

等温5分钟

以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 渐变至 -60°C

等温5分钟

以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 渐变至 $-22/24/26^\circ\text{C}$

等温5分钟

以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 渐变至 -60°C

等温5分钟

以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 渐变至 20°C

标记周期1的结束。

[0284] Karl-Fischer

使用Mettler Toledo DL36 KF Coulometer和Mettler Toledo D0305 Drying Oven测定水分含量。用Hydranal水标准品对KF-Oven (Sigma, 34784, Lot# SZBD 226AV) 校准仪器。将具有冻干饼的小瓶在干燥箱中在 100°C 下加热,并在Hydranal (Sigma, 34836, Lot# SZBE 2830V) 中以库仑法滴定产生的水蒸气。将具有冻干饼的小瓶在烘箱中加热,将样品中的残余水蒸气鼓泡到具有阴极和阳极溶液的容器中,其中水引发二氧化硫被碘氧化。由反应过程中流动的电量计算产生的碘量,从而计算出水量。将样品中产生的水量除以冻干饼重量,计算出水含量百分比。

[0285] 重量摩尔渗透压浓度

使用配备有20 μ L Ease Eject™ Sampler)的凝固点微渗压计进行重量摩尔渗透压浓度测量。测量单位是1 kg纯溶剂中溶质的毫摩尔,表示为重量摩尔渗透压浓度(mOsm/

kg H₂O)。用50 mOsm/kg (3MA005)和850 mOsm/kg (3MA085)校准标准品校准仪器,并在分析前用290mOsm/kg Clinitrol[®] 对照参考溶液(3MA029)验证。样品测试根据SOP:DV-02-023进行。通过凝固点法中的抑制来测量NI-0401制剂的重量摩尔渗透压浓度。

[0286] 凝胶等电聚焦(IEF)

NI0401制剂的pH对其稳定性和生物活性至关重要。NI-0401上的净电荷在其等电点(PI)处为零,在pH低于PI时为正且在pH高于PI时为负。在PI下的溶解度最低。pH的选择不仅取决于溶解度,还取决于稳定性和结合特性。因此,应选择最大溶解度和稳定性的折衷pH用于制剂开发。

[0287] 在IEF样品缓冲液(pH 3-10)中制备NI-0401样品,并将样品不加热连同pH梯度标志物直接上样到IEF垂直平板凝胶(pH 3-10)。制备阳极和阴极运行缓冲液并运行凝胶条件(如Life Technologies Novex Pre-Cast Gel Electrophoresis Manual # IM-1002中所述)。凝胶在100V下运行1小时,200V下运行1小时,500V下运行30分钟。凝胶运行后,将凝胶用12%三氯乙酸(TCA)固定30分钟,并用DI水洗涤2小时,每30分钟更换,以除去12% TCA。然后仅用蓝色染色剂染色凝胶。

[0288] 毛细管等电聚焦(cIEF)

不合格的毛细管等电聚焦cIEF方法仅用于确认目的。(cIEF)通过Proteome PA-800蛋白表征系统使用中性毛细管进行。将pI标志物4.1、5.5、7.0、9.5和10.0掺入样品中,用于pI vs时间的线性校准。通过向240μL含有200μL 3M尿素-cIEF凝胶、12.0μL Pharmalyte 3-10载体两性电解质、20.0μL阴极稳定剂、2.0μL阳极稳定剂和2.0μL每一五种pI标志物的混合物中加入10μL 6mg/mL NI-0401来制备用于分析的样品。将内容物涡旋混合15秒,并在分析前以10,000rpm离心5分钟。

[0289] 冻干参数:迭代#1和2

通过用不同的填充剂和稳定剂掺入NI0401蛋白样品来制备NI-0401 lyo制剂。在添加填充剂和稳定剂后,测量所有制剂和缓冲液的pH,并将pH调节至~5.5±0.05。对于迭代1和2制剂的冻干,将用2.5mg制剂等分的小瓶置于托盘中间,并分别使用表1-2中所示的参数在FTS Lyo Star II冷冻干燥器中冻干。在完成冻干后,将小瓶以600,000 mtorr回填充氮气并停止。在达到设定压力后从架子上取回小瓶。用铝卷边盖快速密封小瓶以防止大气空气污染并防止N₂从小瓶中释放。在T0分析所有冻干的小瓶,并将小瓶在50℃孵育用于在T14进行分析(除了迭代#1,其持续12天)。相应的液体制剂也在50℃下保持14天(除了迭代#1,其持续12天)。

[0290] 冻干参数:迭代#3

NI-0401先导性lyo制剂通过NI-0401蛋白样品pH:5.59与20%海藻糖作为填充剂和0.1%甲硫氨酸+/- 0.1% EDTA作为稳定剂来制备。添加0.1%甲硫氨酸(来自0.3M/4.44%原液)不会改变pH。然而,加入EDTA(来自0.5M的原液)将pH从5.59改变为5.9,用1N HCl将其调节pH为~5.5。将NI0401样品以每瓶~2.5mg等分。用于先导制剂的安慰剂在没有NI-0401样品的情况下制备。对于先导制剂的冻干,将具有先导制剂的小瓶连同填充有~400ul每种安慰剂缓冲液的小瓶(20)一起放置在中间架子中。冷冻干燥架上的其余空间装满每个小瓶含有1ml水的小瓶。将每个制剂的一个小瓶和每个安慰剂的一个小瓶用于通过在冷冻干燥器中插入温度探针来检查温度概况。

[0291] 实施例3:NI-0401的冻干可行性评估

当前NI-0401制剂NI-0401在含有25mM乙酸钠pH5.5、125mM氯化钠和0.02% (w/v) 聚山梨酯80的缓冲液中为~6.0mg/mL,目标是评估相同制剂中抗体的冻干。由于在冻干蛋白/抗体时氯化钠(结晶赋形剂)的存在始终是一个问题,这是因为它随时间吸收水的固有性质,除非它在冻干步骤期间退火。因此,赋形剂筛选涉及检查当前制剂(未透析的制剂,如其掺有填充剂和稳定剂),以及还通过从制剂中将氯化钠透析出来(透析的制剂)并然后掺入填充剂和稳定剂。

[0292] 存在两组制剂,未透析的/透析的NI-0401制剂。对于所有迭代,将2.5mg冻干。对于透析的NI-0401制剂,透析NI-0401样品以从制剂缓冲液中除去盐,将其完成以在初级染色过程中除去共晶点并且避免NI-0401冻干制剂的大气水分吸收。在T0或T14分析制剂。

[0293] 冻干后立即分析制剂的T零稳定性(T0)。

[0294] 将用于14天稳定性的制剂(T14)在50°C孵育。

[0295] 在T0和T14,分析制剂的饼外观、重构时间、液体样品的外观、A280、pH、SDS-PAGE和SEC-HPLC。

[0296] 基于稳定性数据,鉴定显示出最高稳定性和最低杂质水平的具有填充剂/稳定剂的制剂用于先导制剂。

[0297] 实施例4:迭代1:用填充剂筛选

制剂列表

在含有和不含氯化钠的含乙酸钠pH 5.5的当前制剂缓冲液中评估NI-0401制剂的冻干,目标是了解结晶盐对NI-0401样品T0和T14下的稳定性的影响。因此,将NI-0401用含有0.02% W/V聚山梨酯且不含氯化钠的25mM乙酸钠缓冲液透析。

[0298] 将含有不同填充剂(表4)的未透析/透析的NI-0401制剂(浓度为2.5mg/小瓶)冷冻干燥,然后在第0天(T0)和第12天(T12)在50°C下进行评估,以了解制剂关于对照制剂随时间和温度的稳定性,且T0和T14的稳定性结果总结在表5-6中。

[0299] 饼外观和重构时间

分析冻干和液体制剂在T0和T12的稳定性(在50°C孵育T12天)。冷冻干燥后,除了未透析/透析的对照1yo制剂外,所有制剂的饼外观均为无定形(表5)。除了含有甘露醇和乳糖的1yo制剂(其是混浊的)外,所有的1yo和液体制剂都是澄清的(表5和6)。

[0300] A280

数据表明迭代#1制剂的蛋白浓度范围为~5.4至6.1mg/mL,且在T0时或T12之后蛋白浓度没有显著差异,除了含有甘露醇的T12制剂(表5和6),其由于制剂的乳光。

[0301] SEC-HPLC

所有制剂的SEC-HPLC分析显示主峰RT没有变化(约12.4+/-0.2),除了含有乳糖的未透析的Lyo制剂,其在RT的转变11.9分钟时洗脱。

[0302] 未透析和透析的T0 Lyo和液体制剂的SEC-HPLC分析显示主峰响应为总响应的约99%,表明对制剂的冻干没有显著影响。在T0和T12冻干制剂中,含有海藻糖和乳糖的NI-0401制剂显示出最高纯度(分别在主峰响应中回收率>99%)。然而,含有乳糖的制剂改变了主峰保留时间。对于含有甘露醇的制剂,观察到T12处总峰面积的最小回收率(表5-6)。与包括对照制剂的其他制剂相比,含有海藻糖的T0和T12制剂显示出较少的%杂质(表5和6)。与

lyo制剂相比,所有液体制剂在50℃下倾向于更高的降解并且在T12时间点显示出更高的%杂质(表5和6)。

[0303] SDS-PAGE

制剂%纯度的SDS-PAGE凝胶分析数据列于表16中。含有海藻糖的未透析/透析的Lyo制剂显示出低水平的杂质,且与对照制剂相比,在T0和T12的非还原和还原的凝胶上的%纯度分别>98.6%和>97%。含有乳糖的未透析/透析的Lyo NI0401制剂在非还原和还原的凝胶上显示出蛋白迁移率的变化。在还原和非还原的凝胶上,透析的Lyo制剂在T12显示出比未透析的lyo制剂更高的%纯度。含有甘露醇的未透析/透析的Lyo制剂在T0和T12显示出非常低的回收率(80-87%回收率),其在非还原凝胶上显示出更高的%杂质,这与SEC-HPLC数据一致。

[0304] 使用Tiziana SDS-APGE方法用液体制剂的SDS-PAGE分析的定量分析显示,与非还原凝胶上的T0液体制剂相比,T12时液体制剂的降解更高。含有乳糖的其他液体制剂显示出迁移率的变化。与其他制剂相比,含有海藻糖的液体制剂显示出更高的%纯度。

[0305] 基于这些结果,选择进行透析和不进行透析的含有10%海藻糖的制剂用于迭代#2以与不同的稳定剂组合来筛选。

[0306] SEC分析显示,与包括对照制剂的其他制剂相比,含有海藻糖的T0和T12制剂具有高%纯度和低%杂质。

[0307] SEC分析表明,当与冻干制剂相比,所有液体制剂倾向于高LMW降解,显示出当在50℃保持12天(T12)时的高%杂质。

[0308] SEC分析显示,在T12中,含有海藻糖和乳糖的冻干制剂显示出最高的纯度。然而,含有乳糖的制剂改变了主峰保留时间。

[0309] 对于未透析/透析的制剂的非还原和还原凝胶分析,含有海藻糖和乳糖的制剂显示出最高的蛋白纯度及低杂质。与T0处的制剂相比,T12处的制剂显示出更高的杂质,其与SEC-HPLC数据一致。

[0310] 乳糖显示蛋白在还原和非还原凝胶上的迁移率的变化。在未透析/透析的制剂中,含有甘露醇的制剂在凝胶分析中显示低纯度/回收率。

[0311] 除了T12的含有甘露醇的制剂外,在T0时或T12后没有观察到制剂的蛋白浓度的显著差异。含有甘露醇的冻干制剂显示出低溶解度。

[0312] 实施例4:迭代2:用不同的稳定剂筛选

将未透析或透析的NI-0401样品连同稳定剂冻干,目标是理解稳定剂对使用10%海藻糖作为填充剂的冻干的NI-0401制剂稳定性的影响。

[0313] 制剂列表

对于迭代#2,使用10%海藻糖作为填充剂的具有不同稳定剂的未透析/透析的NI-0401制剂总结于表7中。对于制剂研究,将未透析/透析的样品以2.5mg/小瓶等分,用于液体/冻干制剂。冻干后,将未透析/透析的液体和lyo制剂在50℃保持14(T14)天或在T0立即分析。使用A280、SDS-PAGE和SEC-HPLC分析制剂的稳定性,且结果如下。表8和9显示了迭代#2制剂的稳定性分析结果的总结。

[0314] 饼外观和重构时间

表8显示了在T0时和在50℃孵育14天后冻干饼的外观,其对于所有制剂都是无定

形的。与透析制剂相比,未透析制剂中饼的塌陷更高(表8),并且在含有精氨酸的未透析/透析的制剂中塌陷几乎为80-90%。含有抗坏血酸钠的透析制剂也显示出80-90%的塌陷(表18)。

[0315] 制剂的液体外观是澄清的,除了含有精氨酸的lyo和液体制剂以及含有抗坏血酸钠的液体制剂外,其由于沉淀而显得混浊(表8和9)。含有抗坏血酸盐的液体制剂由于抗坏血酸氧化成脱氢抗坏血酸而变黄。

[0316] A280

不同的lyo/液体制剂中蛋白回收率没有显著改变,除了具有10% Tre-精氨酸(*)的冻干的未透析/透析制剂之外,其由于制剂的沉淀/浑浊而显示蛋白浓度的变化。含有10% Tre -Sod.Ascorbate (*#)的液体和冻干的未透析/透析的制剂显示出非常高的蛋白浓度,这是由于抗坏血酸盐对A280测定的干扰(表18-19)。

[0317] SEC-HPLC

未透析和透析的T0和T14 lyo和液体制剂的SEC-HPLC数据显示主峰响应为约96-98%(表8-9),表明除了含有精氨酸的制剂外,对制剂的冻干没有显著影响。由于蛋白的沉淀,含有精氨酸的制剂的主峰响应小于97%,范围分别为在T0 27%至97%和在T14 35-81%(表8-9)。含有EDTA的制剂的总响应略微降低是由于注入柱中的蛋白浓度低。

[0318] 含有精氨酸的液体和lyo制剂也显示出最高的%杂质。含有甲硫氨酸、抗坏血酸Na和EDTA的制剂显示出最少的%总杂质(表8-9)。含有海藻糖或海藻糖-甲硫氨酸的未透析/透析的制剂显示主峰RT没有显著变化。然而,在T0和T14的含有精氨酸或EDTA的透析的NI-0401制剂的SEC-HPLC分析显示保留时间的变化为0.15-0.35。如同预期的,与Lyo液体制剂相比,液体制剂显示出更高的杂质,并且回收率为约96-99%(表8-9)。

[0319] SDS-PAGE

在非还原和还原条件下通过SDS-PAGE分析迭代#2制剂以确定制剂的纯度。用还原和非还原凝胶对所有制剂的图像和定量分析呈现于表10中。含有甲硫氨酸和EDTA的未透析/透析制剂显示出高纯度和低水平的杂质(表10),其显示在非还原凝胶上纯度>99%和在还原凝胶上纯度>95%。在T14的含有精氨酸和抗坏血酸钠的未透析/透析的液体制剂由于沉淀而显示出非常低的回收率(表10),这与SEC-HPLC数据一致。

[0320] 使用Tiziana SDS-PAGE方法用液体制剂的SDS-PAGE分析的定量分析显示,与非还原凝胶上的T0液体制剂相比,T14时液体制剂的降解更高。含有精氨酸的其他液体制剂显示出更高的杂质。与其他制剂相比,含有海藻糖和甲硫氨酸/EDTA的液体制剂显示出更高的%纯度。

[0321] SEC分析显示,与其他制剂相比,含有10%海藻糖和Met+/-EDTA的T0和T14未透析制剂具有高%纯度和低%杂质。含有10%海藻糖和精氨酸的T0和T14制剂显示出最高的杂质和最低的回收率。

[0322] SEC分析表明,当与lyo制剂相比,所有液体制剂倾向于高LMW降解,显示出当在50℃保持14天(T14)时的高%杂质。

[0323] 在T0和T14的含有精氨酸或EDTA的透析的NI-0401制剂的SEC-HPLC分析显示保留时间的变化为0.15-0.35。

[0324] 对未透析/透析制剂的非还原和还原凝胶分析,含有10%海藻糖和Met+/-EDTA/抗

坏血酸钠的制剂显示出最高的蛋白纯度和低杂质。与lyo制剂相比,所有液体制剂显示出高杂质。在未透析/透析的制剂中,含有精氨酸和抗坏血酸钠的制剂显示出低纯度/回收率。

[0325] 除了在T0和T12的含有精氨酸的制剂以及在T14的含有抗坏血酸钠的制剂外,在T0时或T12后没有观察到制剂的蛋白浓度的显著差异。含有抗坏血酸钠的制剂在T14出现黄色。

[0326] 基于来自迭代#2筛选的稳定性数据,选择含有10%海藻糖和0.1%Met(含有和不含EDTA)的未透析的制剂用于迭代#2以使用MDSC分析来分析T_g。

[0327] 实施例5:来自迭代#2筛选的先导制剂的MDSC分析

基于在T0和T14的迭代#2制剂的稳定性分析,选择的未透析的NI-0401的先导制剂是10%海藻糖和0.1%甲硫氨酸+/-EDTA。对先导制剂进行调制DSC以确定制剂的玻璃化转变温度,以便在冻干过程中将制剂的初级干燥温度设定为低于玻璃化转变温度(T_g)。

[0328] 制剂列表

对于MDSC研究,使用10%或20%海藻糖作为填充剂,用不同的稳定剂制备未透析和透析的NI-0401液体和冻干制剂,并将样品以每瓶2.5mg进行等分。用于MDSC研究的制剂总结在表11中,并且使用参数进行MDSC分析,即将30μL液体制剂装载到T Zero盘中并用T Zero密封盖封闭。将用T Zero密封盖封闭的空T Zero盘用作参考。

[0329] 先导制剂的T_g的测定

对未透析/透析的先导制剂和当前制剂进行MDSC,以测定包括玻璃化转变温度(T_g)的热事件。MDSC分析结果总结在表12中。如表12所示,对当前制剂的MDSC显示共晶点,其通过连同0.1%甲硫氨酸存在于先导制剂(未透析/透析的)中的10%海藻糖的存在而完全去除。然而,在未透析的制剂中氯化钠的存在将玻璃化转变温度从-32°C降低至-37°C。发现含有0.1%Met的未透析和透析的制剂的T_g分别为-36.88°C和-31.87°C。

[0330] 不同退火温度下T_g的测定

接下来,在不同退火温度下对未透析的先导制剂进行MDSC。由于先导制剂的转变温度为-37°C,因此尝试降低玻璃化转变温度,因为在冻干的初级干燥方法步骤过程中难以用温度和压力控制将产物温度保持在或低于-37°C的塌陷温度。并且如果架温度低于-37°C,则冻干总时间会更长,并且不是节约成本的。如表12所示,在不同的退火温度下对先导制剂(含有10%海藻糖和0.1%甲硫氨酸的未透析制剂)的MDSC显示未透析的先导制剂的玻璃化转变温度(-37°C的T_g)没有较大变化。

[0331] 对含有10%和20%海藻糖的先导制剂测定T_g

在不同温度下的退火过程没有降低玻璃化转变温度,因此评估含有较高量海藻糖的制剂以降低T_g。此外,MDSC分析表明含有20%海藻糖和0.1%EDTA的制剂与含有10%海藻糖和0.1%甲硫氨酸的先导制剂之间没有显著差异。此外,在含有10%海藻糖-无/10%海藻糖-0.1%甲硫氨酸/20%海藻糖+0.1%EDTA的未透析的NI0401样品中,在色谱图(SEC-HPLC)中的保留时间没有观察到变化。如表12所示,对先导制剂(含有0.1%甲硫氨酸的未透析制剂)的MDSC,其中海藻糖增加(从10%至20%)降低T_g ~2(°C),这对于冻干过程是期望的,因此选择含有20%海藻糖和0.1%甲硫氨酸+/-0.1% EDTA的该制剂替代含有10%海藻糖的制剂进行最后迭代。

[0332] 添加10%海藻糖作为填充剂去除了含有0.1%甲硫氨酸的未透析先导制剂中由于

NaCl的存在引起的共晶点。

[0333] 退火温度的变化对先导制剂的T_g没有显示出影响。

[0334] 海藻糖浓度从10%增加到20%使含有0.1%甲硫氨酸的先导制剂的T_g从-36°C降低到-34°C,这对于冻干过程是期望的。向含有20%海藻糖的先导制剂中加入EDTA对T_g没有影响。

[0335] 对含有20%海藻糖和0.1%Met(含有和不含EDTA)的制剂的MDSC分析显示T_g为~-34.6°C,这对于冻干过程是期望的。

[0336] 将含有20%海藻糖和0.1%Met(含有和不含EDTA)的制剂选作用于迭代#3的先导制剂(表13)。

[0337] 实施例6:先导制剂的迭代#3冻干和稳定性分析

基于来自迭代#2的稳定性分析和MDSC结果,选择含有20%海藻糖0.1%甲硫氨酸的未透析的NI-0401制剂用于最终冻干循环和在T₀和T₁₄的短期稳定性评估。该分析包括通过Karl Fisher的残留水分含量、外观、重构时间、A₂₈₀、通过SEC-HPLC和SDS-Page的纯度、重量摩尔渗透压浓度、%水分含量、凝胶IEF和cIEF。最终迭代#3的结果如下所示,且稳定性分析数据的总结显示于表14。

[0338] 饼外观和重构时间

所有迭代#3先导制剂显示完整的饼,除了对照制剂,其显示相对更多的塌陷。所有制剂在小于1分钟内溶解,且所有制剂都是澄清的,除了对照制剂在50°C时略微混浊(离心并用于进一步的稳定性分析)。

[0339] pH

重构后和1yo之前的不同1yo制剂的pH显示在表14中。数据表明,对于含有海藻糖的先导制剂,pH值从5.5变为5.9,对于不含海藻糖的当前制剂,pH值从5.5变为7.6。冻干后pH变化的原因可能是由于冻干过程中当前制剂中乙酸的蒸发,这对于当前制剂更为明显。填充剂和稳定剂的存在可以帮助稳定先导制剂中的pH。

[0340] A₂₈₀

不同制剂的蛋白浓度显示在表14中。使用Nano Drop分光光度计在未稀释的情况下测量不同制剂的蛋白浓度(mg/mL),其基于Tiziana提供的A_{280nm}处1mg/mL的理论消光为1.52。加入20%海藻糖后,蛋白浓度略有下降,这是由于加入20%海藻糖后体积增加。数据显示,在4°C或50°C下孵育制剂14天后,蛋白浓度没有显著变化,但当前制剂在50°C下由于轻微沉淀除外。

[0341] 水分含量(%)

使用Mettler Toledo DL36 KF Coulometer测定不同先导制剂以及当前制剂的水分含量,结果显示在表14中。含有Met/ Met+EDTA的先导制剂的水分含量分别为3.34%和2.32%。在4°C和50°C下孵育制剂14天后,水分含量没有显著变化。

[0342] 重量摩尔渗透压浓度

重构后不同的1yo制剂的重量摩尔渗透压浓度示于表14中。数据表明含有海藻糖的先导制剂是高渗的,并且当前制剂如同预期是等渗的。在4°C和50°C下将制剂孵育14天后,重量摩尔渗透压浓度没有变化。

[0343] SEC-HPLC

使用SEC-HPLC分析评估NI-0401制剂的%主峰响应、总面积响应(AUC)以及%杂质,且结果显示在图5-9和表14中。所有NI-0401制剂的主面积响应(AUC和%)显示于图5。T0和T14 lyo先导制剂的总体数据,主峰响应为总峰响应的约99.90%(图5),表明对先导制剂的冻干没有显著影响。然而,保持在50°C/4°C的对照制剂分别显示出较低的主峰响应82%和98%(图5)。在T14(50°C)下对照制剂的%主峰回收率的降低是由于样品的轻微浑浊/沉淀。在15-17 min的保留时间之间观察到的峰是由于缓冲液/制剂中存在的组分,例如盐/甲硫氨酸/EDTA。

[0344] T14的所有制剂的色谱图显示,在50°C和4°C下保持的主峰RT没有显著变化。

[0345] 将海藻糖掺入制剂导致浓度略微降低,因此导致在T0/T14(4°C)下,含有海藻糖和Met/Met + EDTA的制剂的主峰响应和总响应的响应较低(图6)。与对照制剂相比,含有甲硫氨酸/Met + EDTA的制剂显示出最少的%总杂质(图7)。与保持在4°C的T14对照制剂相比,50°C下的T14对照制剂显示出最高水平的杂质(图7)。与T0制剂相比,T14制剂的%总峰回收率或%主峰回收率不受影响(图8-9)。

[0346] SDS-PAGE

与对照制剂相比,保持在50°C/4°C的含有海藻糖和甲硫氨酸/海藻糖、甲硫氨酸和EDTA的T0和T14先导Lyo制剂在非还原和还原凝胶上显示出更高的纯度(表15-16;图10-11),且纯度百分比分别大于99.3%和98.5%。与保持在4°C的T14对照制剂相比,50°C下的T14对照制剂显示出最高水平的杂质(表15-16;图-11)。在还原和未还原凝胶上,T0和T14的先导制剂的%纯度没有观察到显著变化(表15-16;图10-11)。

[0347] IEF凝胶分析

对NI-0401样品进行IEF凝胶分析测试,以使用未经验证的方法定性地了解样品的pI。如图12所示,将不同浓度的对照制剂T14 lyo(50°C)和NI-0401 ref标准品上样至IEF凝胶并分析。观察到样品在孔附近的聚焦(这是由于样品的高pI),其显示样品的近似pI>9.0,因为高于9.5的pI标志物没有在凝胶上完全分辨。

[0348] 由于对照制剂和NI0401参考标准品的IEF凝胶分析显示NI0401样品的pI过高(pI>9)而无法在IEG凝胶上分离,如同样品保留在孔附近,因此没有对其他先导制剂进行凝胶IEF的进一步分析。总之,对照NI-0401制剂的IEF凝胶分析显示NI0401样品的pI约为~9.25。

[0349] cIEF分析

通过cIEF分析先导T0和T14制剂,以了解NI0410制剂的异质性。为了定性确认NI-0401的pI,使用cIEF并且NI0401的典型概况如下所示(图13),且当前制剂NI-0401样品的异质群体显示碱性峰(pI在>9.27-9.45之间)、酸性峰(与<9.3-8.60之间的主峰pI相比)和主峰群(pI在~9.25-9.37之间)。基于不同制剂中NI-0401样品的酸性、碱性和主峰群的pI分析数据。毛细管等电显示,在将制剂保持在4°C或50°C 14天后,相比于NI-0401的主峰,先导制剂中主峰、碱性峰和相对酸性峰群的pI没有显著差异。然而,在T14-50°C的对照或当前制剂中,主峰比降低,且相对酸峰比增加,表明脱酰胺作用(图15)。对照/当前制剂中脱酰胺作用的这种增加可能是由于冻干后制剂的pH增加(从~5.5至7.5)。

[0350] 结论

对先导制剂的分析研究证实了两种先导制剂(即在含有20%海藻糖、0.1%甲硫氨酸的25mM乙酸钠pH5.5、125mM氯化钠、0.02% (w/v)聚山梨酯80缓冲液中的NI-0401;和在

含有20%海藻糖、0.1%甲硫氨酸、0.1%EDTA的25mM乙酸钠pH5.5、125mM氯化钠、0.02% (w/v) 聚山梨酯80缓冲液中的NI-0401)的稳定性。

[0351] SEC分析显示,与当前制剂相比,含有10%海藻糖和Met+/-EDTA T0和T14的先导制剂具有高%纯度和低%杂质。与T0和T14的对照制剂相比,先导制剂的%主峰回收率>97%。

[0352] 对先导制剂的非还原和还原的凝胶分析显示含有10%海藻糖和Met +/-EDTA的制剂具有最高的蛋白纯度。对照制剂显示出更多的%杂质。

[0353] 除了T14 50°C的当前制剂外,在T0时或T14后没有观察到制剂的蛋白浓度的显著差异。

[0354] 当前制剂的pH从5.5变为7.5,先导制剂pH从5.5变为5.9。

[0355] 所有制剂在T0和T14没有观察到重量摩尔渗透压浓度或%水分含量的变化。

[0356] NI0401对照制剂(T0-Lyo)的IEF-凝胶分析显示pI>9.25并且样品保留在凝胶孔附近而没有明显分离。

[0357] cIEF分析显示在T0和T14的先导制剂中,NI-0401样品的主峰、碱性峰和相对酸性群的pI之间没有显著差异。

[0358] cIEF分析显示在T14-50°C下NI-0401当前制剂的变化,其中主峰比率降低并且相对酸性峰比率增加,表明对照制剂在T14-50°C下脱酰胺。

[0359] 概述

基于用填充剂和稳定剂的赋形剂筛选的累积数据和稳定性概况,用于开发NI-0401/CD3抗体的口服冻干剂量的最终先导制剂是:

NI-0401于含有20%海藻糖、0.1%甲硫氨酸的25mM乙酸钠pH5.5、125mM氯化钠、0.02% (w/v) 聚山梨酯80缓冲液中,和NI-0401于含有20%海藻糖、0.1%甲硫氨酸和0.1% EDTA的25mM乙酸钠pH5.5、125mM氯化钠、0.02% (w/v) 聚山梨酯80缓冲液中。

[0360] 实施例7: 抗CD3制剂在短期治疗原发性胆汁性肝硬化(PBC)和长期治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)中的评估。

[0361] 设计本文呈现的研究以评估抗CD3制剂在原发性胆汁性肝硬化(PBC)的短期治疗和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的长期治疗中的用途。

[0362] 在这些研究中,将抗CD3制剂口服施用,每天一次,持续7天,然后为药物假期重复周期。该研究将包括21名患者,其中7名将接受安慰剂,且其中14名将以5mg/天的剂量接受口服抗CD3抗体制剂。在这些研究中,健康志愿者将接受以下剂量:0.5mg、1.0mg、2.5mg、5mg、10mg,每天一次,持续7天,以确定安全剂量。给药方案将持续8-12周,且对PBC的免疫生物标志物和/或临床终点进行以下期中分析。给药方案将以给药和停药的重重复周期持续。在这些研究中,口服抗CD3抗体制剂可以与佐剂或ATRA或抗炎剂或其他合适的第二药剂组合。在研究中,可以将奥贝胆酸与口服抗CD3抗体分开施用。

[0363] 表1: 用于迭代#1制剂的冻干的温度和压力参数

步骤	温度	温度渐变(°C/min)	保持(以hr计)	压力
上样	环境	N/A	N/A	NA
冷冻	-50°C	1°C/min	2	NA
初级干燥	-30°C	1°C/min	11.8	75 mTorr
次级干燥	+20°C	1°C/min	5.6	75 mTorr

[0364] 表2: 用于迭代#2制剂的冻干的温度和压力参数

步骤	温度	温度渐变(°C/min)	保持(以hr计)	压力
上样	环境	N/A	N/A	NA
冷冻	-50°C	1°C/min	2	NA
初级干燥	-30°C	1°C/min	15	75 mTorr
次级干燥	+20°C	1°C/min	5.0	75 mTorr

[0365] 表3: 用于迭代#3制剂的冻干的温度和压力参数

步骤	温度	温度渐变(°C/min)	保持(以hr计)	压力
上样	环境	N/A	N/A	NA
冷冻	-50°C	1°C/min	4	NA
初级干燥	-32°C	1°C/min	60hrs	70mTor
次级干燥	+20°C	1°C/min	8hrs	70mTorr

[0366] 表4: 冻干未透析/透析的NI-0401:含有填充剂的制剂的可行性评估

制剂#	制剂类型	碳水化合物/填充剂	缩写
1	未透析的 NI-0401	对照(无)	Undia-液体/lyo-无
2	于 25mM 乙酸钠/125mM NaCl/0.02% W/V 聚山梨酯	10%海藻糖	Undia -液体/lyo-Tre
3		10%蔗糖	Undia -液体/lyo-Suc
4		5%甘露醇	Undia -液体/lyo-Man
5		5%乳糖	Undia -液体/lyo-Lac
6		对照(无)	Dia-液体/lyo-无
7	透析的 NI-0401 于 25mM 乙酸钠/0.02% W/V 聚山梨酯	10%海藻糖	Dia -液体/lyo-Tre
8		10%蔗糖	Dia -液体/lyo-Suc
9		5%甘露醇	Dia -液体/lyo-Man
10		5%乳糖	Dia -液体/lyo-Lac

表 5: 填充剂对 T0 和 T12 的 NI-0401 液体制剂稳定性的影响: 饼外观、重构时间、A280 和 SEC-HPLC。
迭代 #1 Lyo 制剂稳定性结果

时间 点	T0 Lyo					T12 Lyo				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
制剂编号:	无	10%Tre	10%Suc	5%Man	5%Lac	无	10%Tre	10%Suc	5%Man	5%Lac
制剂类型	无	白色; 晶体	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 晶体	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形
饼外观	Undia	白色; 晶体	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 晶体	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形
Dia	白色; 晶体	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 晶体	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形
% 塌陷	10	5	5	5	20	10	5	5	5	20
Dia	30	5	5	5	20	30	5	5	5	20
重构时间	5	75	45	50	45	10	15	185	*部分可溶	25
Dia	5	85	90	75	75	20	25	185	55	20
Undia	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	浑浊的	澄清的	澄清的	澄清的	浑浊的	澄清的
液体外观	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的
Dia	5.9	5.62	5.5	5.7	5.83	6.1	5.62	5.84	4.4*	5.45
Undia	5.98	5.47	5.5	5.88	5.9	6.12	5.45	5.82	5.81	5.78
Dia	99.1	99.9	99.8	99.4	99.6	94.64	99.67	98.84	72.24	99.01
SEC-HPLC	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Undia	0.93	0.1	0.2	0.6	0.4	5.36	0.33	1.16	27.76	0.99
Dia	99.1	99.5	99.7	99.47	99.6	82.76	99.47	75.9	82.45	99.35
% 纯度	0.9	0.5	0.3	0.53	0.4	17.24	0.53	24.1	17.55	0.65
% 杂质										

*冻干后, 含有甘露醇的制剂显示出较低的溶解度。

表 6: 填充剂对 T0 和 T12 的 NI-0401 液体制剂稳定性的影响: 饼外观、饼重构时间、A280 和 SEC-HPLC

迭代 #1 液体制剂稳定性结果		T0 液体					T12 液体				
时间点	制剂编号:	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
液体外 观	Undia	无	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的
	Dia	无	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的
浓 度 (mg/mL)	Undia	5.74	5.59	5.56	5.87	5.77	6.14	5.74	5.71	5.91	5.94
	Dia	5.9	5.81	5.62	5.8	5.78	6.1	5.65	5.7	5.91	5.98
SEC- HPLC	Undia	% 纯度	99.7	99.7	99.68	99.7	99.68	96.96	96.38	96.16	94.5
		% 杂质	0.3	0.3	0.32	0.3	0.32	3.04	3.612	3.84	5.5
	Dia	% 纯度	99.57	99.57	99.59	99.68	99.69	91.25	91.08	94.8	78.64
		% 杂质	0.43	0.43	0.41	0.32	0.31	8.75	8.92	5.2	21.36

[0367] 表7: 迭代 #2 制剂: 用稳定剂筛选。

制剂#	制剂类型	填充剂	稳定剂	缩写
1	未透析的 NI-0401 于 25mM 乙酸钠 /125mM NaCl/0.02% W/V 聚山梨酯	10%海藻糖	无	Undia-liq/lyo Tre-无
2		10%海藻糖	0.1%甲硫氨酸	Undia -liq/lyo Tre-Met
3		10%海藻糖	5%精氨酸	Undia -liq/lyo Tre-Arg
4		10%海藻糖	1%抗坏血酸钠	Undia -liq/lyo Tre-Sod.Asc.
5		20%海藻糖	0.1% EDTA	Undia -liq/lyo Tre-EDTA
6	透析的 NI-0401 于 25mM 乙酸钠 /0.02% W/V 聚山梨 酯	10%海藻糖	无	Dia-liq/lyo- Tre-无
7		10%海藻糖	0.1%甲硫氨酸	Dia -liq/lyo- Tre-Met
8		10%海藻糖	5%精氨酸	Dia -liq/lyo- Tre-Arg
9		10%海藻糖	1%抗坏血酸钠	Dia -liq/lyo- Tre-Sod.Asc.
10		20%海藻糖	0.1% EDTA	Dia -liq/lyo- EDTA

表 8: 稳定剂对 T0 和 T14 的 NI-0401 Lyo 制剂的影响: 饼外观、饼重构时间、A280 和 SEC-HPLC。

时间/点	T0 Lyo					T12 Lyo				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
制剂编号:	Tre-无	Tre-Met	Tre-Arg	Tre-Sod.Asc o.	Tre-EDTA	Tre-无	Tre-Met	Tre-Arg	Tre-Sod.Asc o.	Tre-EDTA
制剂类型	Tre-无	Tre-Met	Tre-Arg	Tre-Sod.Asc o.	Tre-EDTA	Tre-无	Tre-Met	Tre-Arg	Tre-Sod.Asc o.	Tre-EDTA
饼外观	白色; 无定形	白色; 无 定形	白色; 无 定形	白色; 无定形	白色; 无 定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 无 定形
	Undia					无定形				白色; 无 定形
	Dia					白色; 无定形				白色; 无 定形
%塌陷	10	10	90	10	10	20-30	20-30	80-90	80-90	10
	10	20	30	20	20	5-10	5-10	40-50	5-10	10-15
重构时 间	15	35	50	75	58	15	12	>300	150	50
	30	35	55	20	45	22	15	10	20	20
液体外 观	澄清的	澄清的	浑浊的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	浑浊的	澄清的	澄清的
	Dia					澄清的				澄清的
浓 度 (mg/m L)	5.2	5.2	1.13*	374*	4.67	5.4	5.4	1.052 (*)	357.6 (#)	4.77
	5.35	5.36	4.24*	338*	4.68	5.67	5.52	4.208 (*)	264.35(#)	4.72
SEC- HPLC										
	Undia									
	%纯度	99.26	26.38	99.87	99.86	98.8	99.9	48	96.8	99.3
	%杂质	0.74	73.62	0.13	0.14	1.2	0.1	52	3.2	0.7
	Dia									
	%纯度	99.87	97.47	100	99.5	99.59	100	62.77	100	100
	%杂质	0.13	2.53	0	0.5	0.41	0	37.23	0	0

表 9: 填充剂对 T0 和 T12 的 NI-0401 液体制剂稳定性的影响: 饼外观、饼重构时间、A280 和 SEC-HPLC 迭代 # 2 液体制剂稳定性结果

时间 点	T0 液体					T14 液体				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
制剂编号:	Tre- 无	Tre- Met	Tre- Arg	Tre- Sod.Asco.	Tre- EDTA	Tre- 无	Tre- Met	Tre- Arg	Tre- Sod.Asco.	Tre- EDTA
制剂类型										
浓度 (mg/mL)	Undia 5.3	5.3	2.3*	379(#)	4.6	5.6	5.4	0.71 (*)	12.4(*)	4.7
	Dia 5.4	5.3	4.2*	338(#)	4.4	5.6	5.6	4.6(*)	10.4(*)	4.7
液体 外观	Undia 澄清的	澄清的	浑浊的*	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	浑浊的*	黄色*	澄清的
	Dia 澄清的	澄清的	浑浊的*	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	浑浊的*	黄色*	澄清的
SEC- HPLC	Undia %纯度	99.37	85.5	100	99.13	96.1	98.2	35	98.53	96.8
	%杂质	0.63	14.5	0	0.87	3.9	1.8	65	1.47	3.2
	Dia %纯度	100	96.9	100	99.2	97.78	98.78	81.9	99.4	98.5
	%杂质	0	0.31	3.1	0	0.8	2.22	1.22	0.6	1.5

*制剂沉淀; #抗坏血酸钠干扰 A280 测定。

[0368] 表10: 在非还原凝胶和还原凝胶上T0和T14的未透析/透析的Lyo制剂的%纯度和杂质

制剂		非还原凝胶				还原凝胶			
		T0		T14		T0		T14	
		%杂质	%纯度	%杂质	%纯度	%杂质	%纯度	%杂质	%纯度
未透析的 Lyo制剂	Tre-无	0.08	99.92	0.04	99.96	4.75	95.25	4.28	95.72
	Tre-甲硫氨酸	0.01	99.99	0.03	99.97	4.29	95.71	4.18	95.82
	Tre-精氨酸	5.97	94.03	0.55	99.45	10.41	89.59	5.63	94.37
	Tre-Sod.Asco	0.19	99.81	1.09	98.91	3.42	96.58	7.29	92.71
	Tre-EDTA	0.07	99.93	0.27	99.73	3.74	96.26	3.76	96.24
透析的 Lyo制剂	Tre-无	0.87	99.13	1.40	98.60	3.09	96.91	3.28	96.72
	Tre-甲硫氨酸	0.84	99.16	0.68	99.32	3.10	96.90	3.26	96.74
	Tre-精氨酸	4.82	95.18	5.10	94.90	5.64	94.36	5.82	94.18
	Tre-Sod.Asco	4.30	95.70	3.49	96.51	2.26	97.74	2.53	97.47
	Tre-EDTA	0.48	99.42	0.80	99.20	1.85	98.15	2.01	97.99

[0369] 表11: 用于MDSC分析的迭代#2:先导NI-0401制剂。

制剂#	制剂类型	填充剂	稳定剂	缩写
1	未透析的 NI-0401 于 25mM 乙酸钠 /125mM	无	无	未透析的-无 (对照)
2	NaCl/0.02% W/V 聚山梨酯	10%海藻糖	0.1%甲硫氨酸	Undia -Tre-Met (先导制剂)
3	透析的 NI-0401 于 25mM 乙酸钠 /0.02% W/V 聚山梨酯	10%海藻糖	0.1%甲硫氨酸	Dia -liq Tre-Met (先导制剂)
4	未透析的 NI-0401 于 25mM 乙酸钠 /125mM NaCl/0.02% W/V 聚山梨酯	20%海藻糖	0.1%甲硫氨酸	Undia -20%Tre-Met
5		20%海藻糖	0.1% EDTA	Undia -20%Tre-EDTA
6		20%海藻糖	0.1%甲硫氨酸 + 0.1% EDTA	Undia -20%Tre-Met-EDTA

[0370] 表12: 未透析/透析的先导制剂和当前制剂的凝固温度、融解温度和制剂玻璃化转变温度(tg)。

液体制剂	液体制剂的 MDSC 结果				
	退火温度 (°C)	凝固温 度 (°C)	融解温 度 (°C)	T _g (°C)	共晶点 (°C)
未透析的当前制剂 (对照)	N/A	-11.01	-1.02	-	-24.67
未透析的 NI0401 先导制剂; 10% 海藻糖; 0.1% 甲硫氨酸 (Undia-先导)	N/A	-14.13	-1.52	-36.88	-
透析的 NI0401; 10% 海藻糖; 0.1% 甲硫氨酸 (Dia-先导)	N/A	-8.06	-0.49	-31.87	-
未透析的 NI0401 先导制剂; 10% 海藻糖; 0.1% 甲硫氨酸 (Undia-先导)	-22	-10.08	1.78	-36.87	-
	-24	-14.85	1.79	-37.65	-
	-26	-15.26	1.95	-37.44	-
未透析的 NI0401 先导制剂; 10% 海藻糖; 0.1% 甲硫氨酸 (Undia-先导-10% Tre+Met)	N/A	-14.13	-1.52	-36.87	-
未透析的 NI0401 先导制剂; 20% 海藻糖; 0.1% 甲硫氨酸 (Undia-先导-20% Tre+Met)	N/A	-12.49	-2.60	-34.69	-
未透析的 NI0401 先导制剂; 20% 海藻糖; 0.1% EDTA (Undia-先导-20% Tre+EDTA)	N/A	-9.17	-2.68	-34.69	-
未透析的 NI0401 先导制剂 20% 海藻糖 0.1% 甲 硫氨酸和 0.1% EDTA (Undia- 先导-20% Tre+Met+EDTA)	N/A	-13.11	-2.50	-34.66	-

[0371] 表13: 迭代#3 NI-0401先导制剂。

含有 NI-0401 的 Lyo 制剂				缩写
制剂#	样品	填充剂	稳定剂	
1		无	无	对照
2	NI-0401 于 25mM 乙酸钠 /125mM NaCl/0.02 % W/V 聚山梨酯	20%海藻糖	0.1% 甲硫氨酸	20%Tre-Met (Met 制剂)
3		20%海藻糖	0.1% 甲硫氨酸+ 0.1% EDTA	20%Tre-Met-EDTA (Met+EDTA 制剂)

表 14: 迭代#3 Lyo 制剂: 稳定性结果的总结

时间点	T0 Lyo			T14-50°C Lyo			T14-4°C Lyo		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
制剂编号:	对照	Tre-Met	Tre-EDTA	对照	Tre-Met	Tre-EDTA	对照	Tre-Met	Tre-EDTA
制剂类型	白色; 晶体	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 晶体	白色; 无定形	白色; 无定形	白色; 晶体	白色; 无定形	白色; 无定形
饼外观	5-40%	5-10%	5-10%	50-60%	10-20%	10-20%	40-60%	10-20%	10-20%
%塌陷	5	45	45	5	40	40	5	40	40
重构时间 (sec)	澄清的	澄清的	澄清的	浑浊的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的	澄清的
溶液外观	7.14	5.8	5.72	7.57	5.9	5.81	7.14	5.8	5.72
pH	6.1	5.5	5.4	5*	5.7	5.6	6.2	5.3	5.4
浓度(mg/mL)	10.86*	3.34	2.32	7.41	3.04	2.88	N/A	N/A	N/A
%水分	289	846	855	284	900	907	281	835	852
重量摩尔渗透压浓度 (mOsmo/Kg)	98.85	99.98	99.9	82.07	99.09	99.42	98.56	99.58	99.48
SEC- %纯度	1.15	0.02	0.1	17.93	0.9	0.57	1.55	0.42	0.52
HPLC %杂质									

[0372] 表15: 非还原凝胶上T0和T14的Lyo先导制剂的%纯度和杂质。

Lyo 制剂	非还原凝胶					
	T0		T14-50°C		T14-4°C	
	%	%	%	%	%	%
	纯度	杂质	纯度	杂质	纯度	杂质
对照-无	98.3	1.7	85.2	12.3	98.3	1.7
20% Tre+0.1% Met	99.4	0.6	99.4	0.6	99.4	0.6
20% Tre+0.1% Met+0.1%EDTA	99.4	0.6	99.3	0.7	99.7	0.3

[0373] 表16: 还原凝胶上T0和T14的Lyo先导制剂的%纯度和杂质。

Lyo 制剂	还原凝胶					
	T0		T14-50°C		T14-4°C	
	%	%	%	%	%	%
	纯度	杂质	纯度	杂质	纯度	杂质
对照-无	98.3	1.7	95.7	4.3	98.5	1.5
20% Tre+0.1% Met	98.5	1.5	98.5	1.5	98.9	1.1
20% Tre+0.1% Met+0.1%EDTA	99.0	1.0	99.5	0.5	99.6	0.4

[0374] 其他实施方案

虽然结合其详细描述对本公开进行描述,但前述描述意在举例说明,并非要限制由所附权利要求的范围定义的本公开的范围。其它方面、优点、和变化在下述权利要求的范围内。

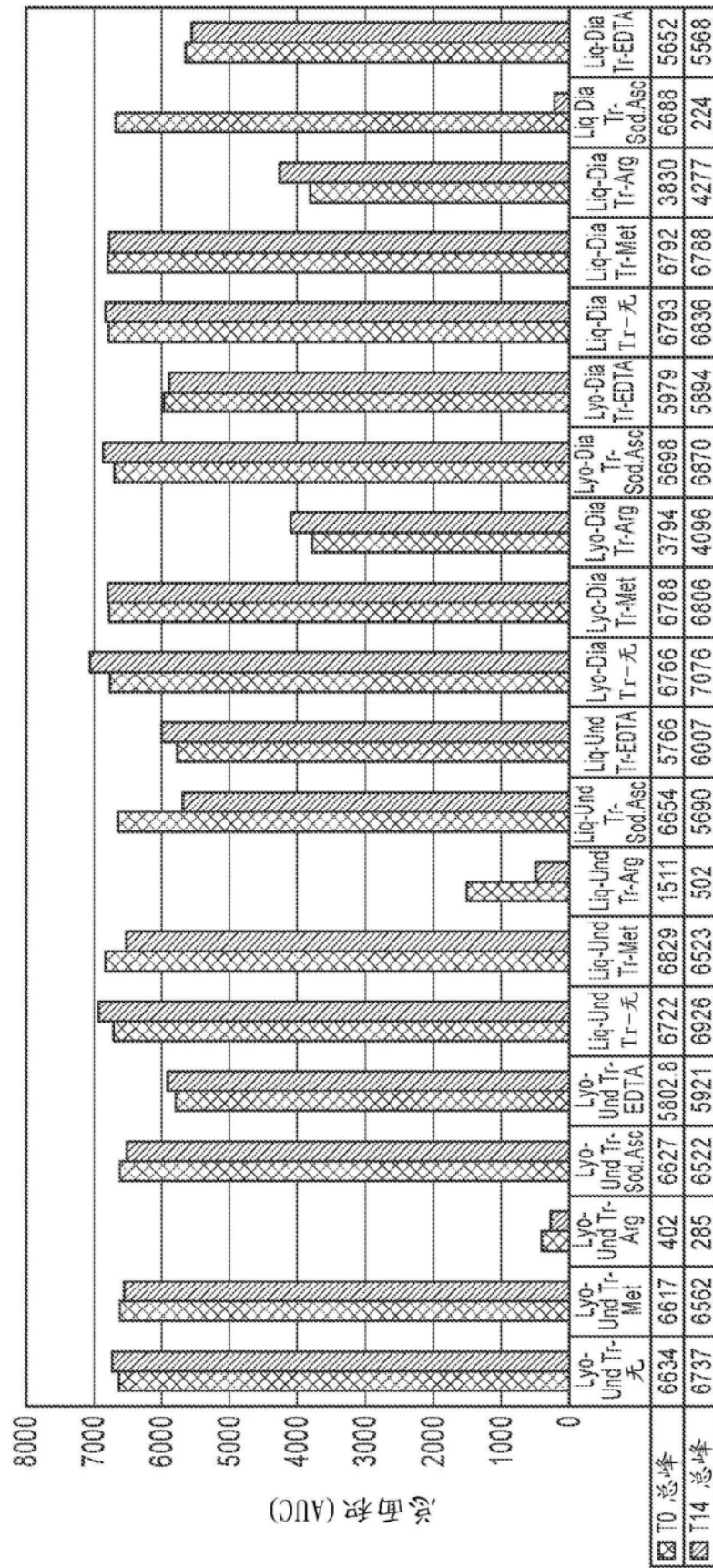


图1

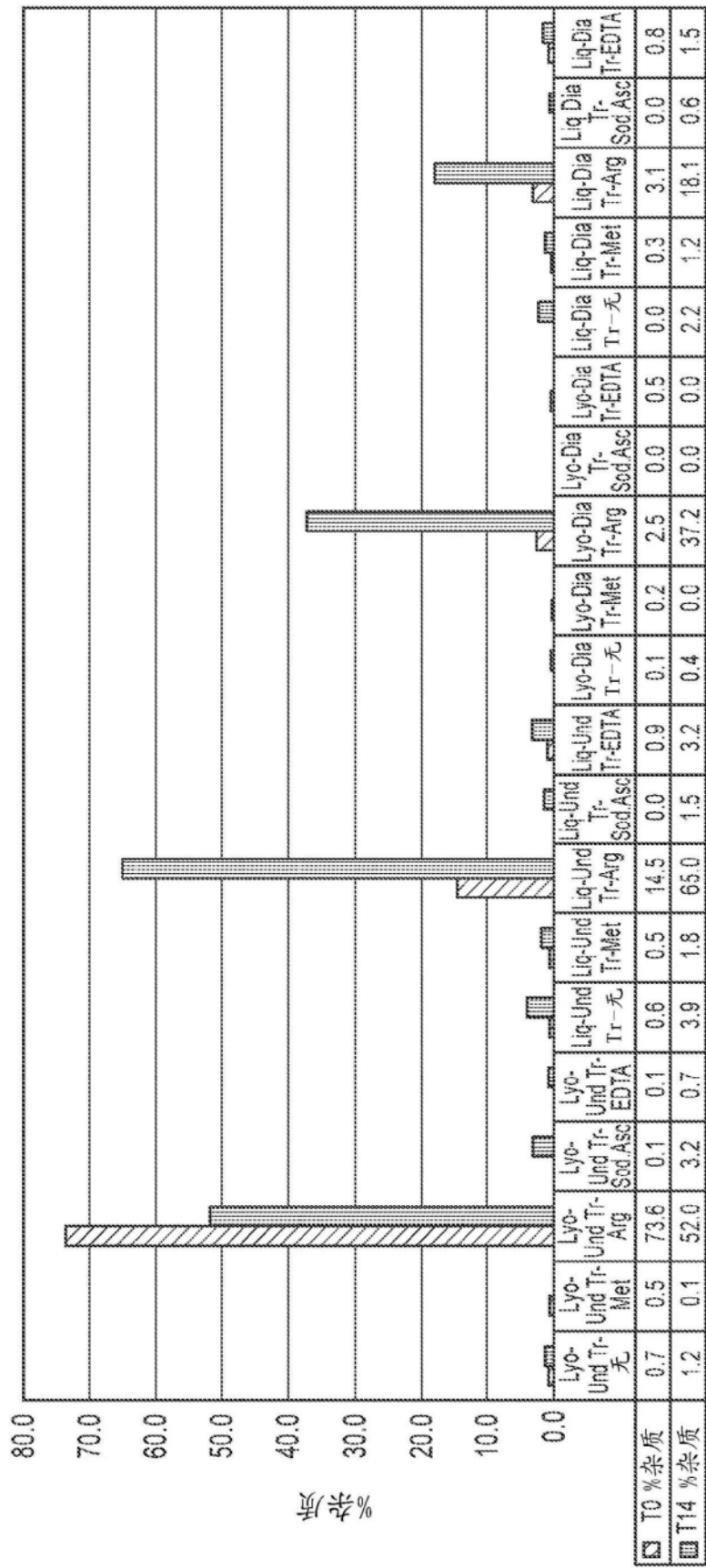


图2

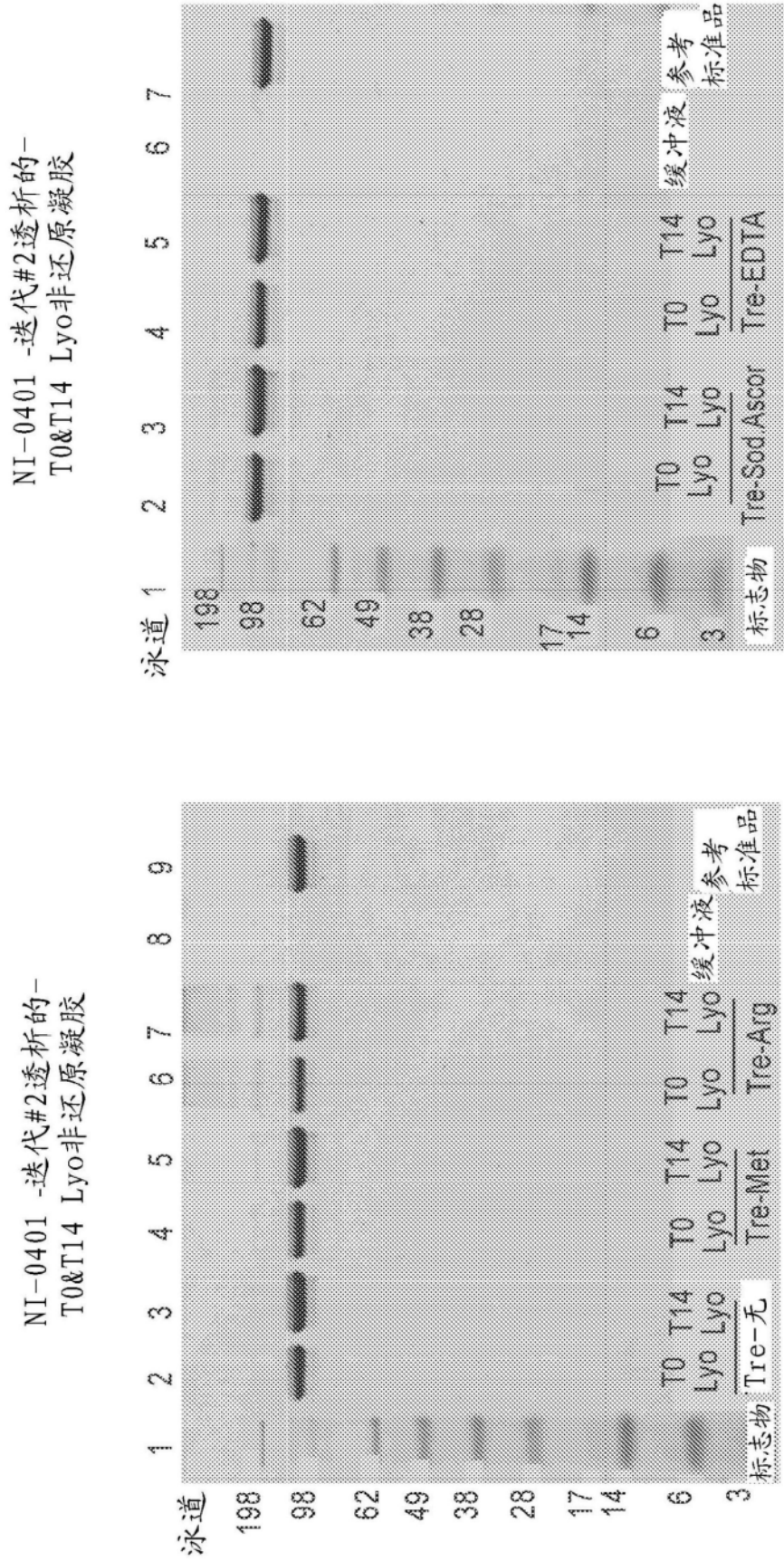


图3

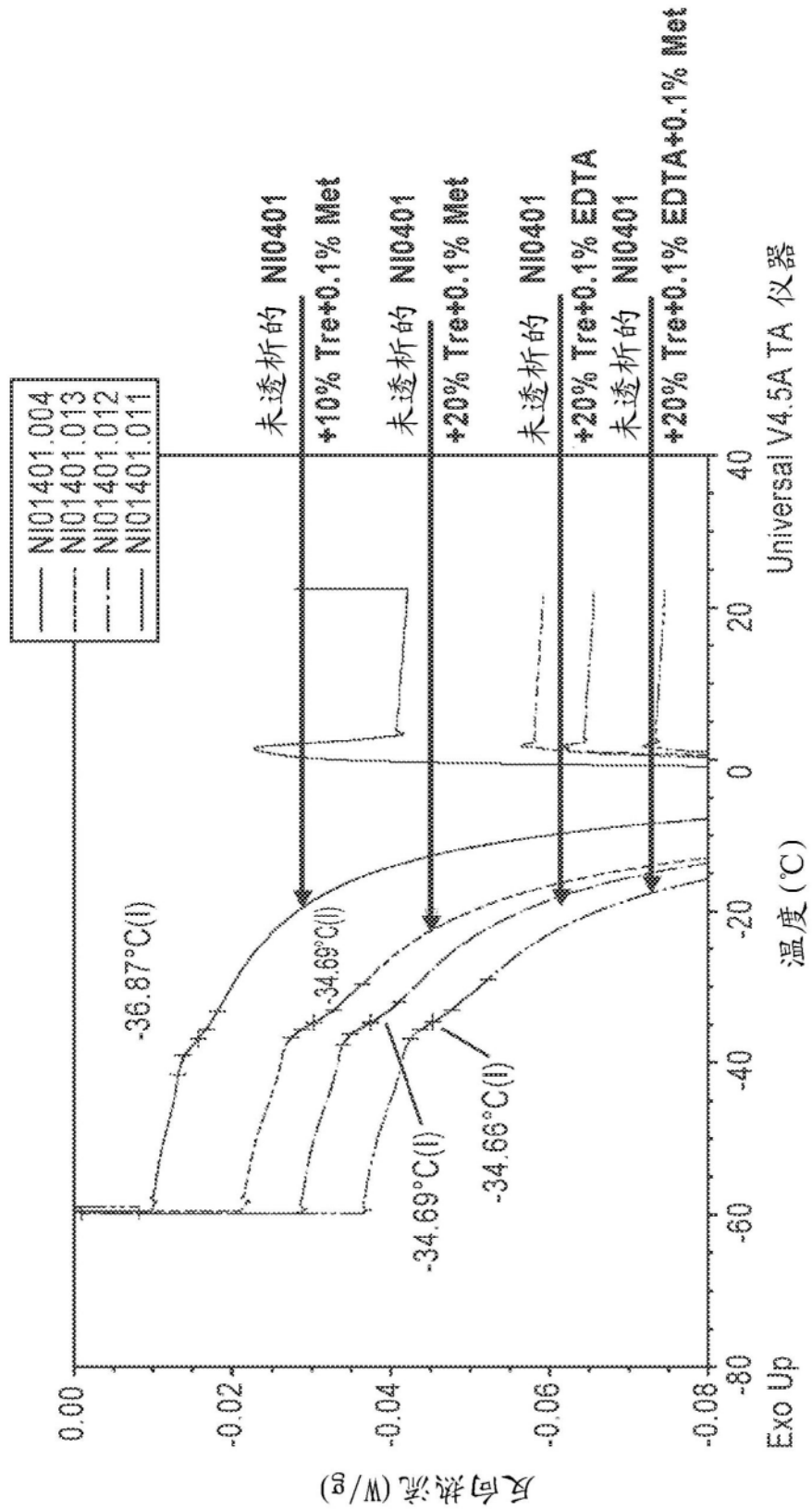


图4

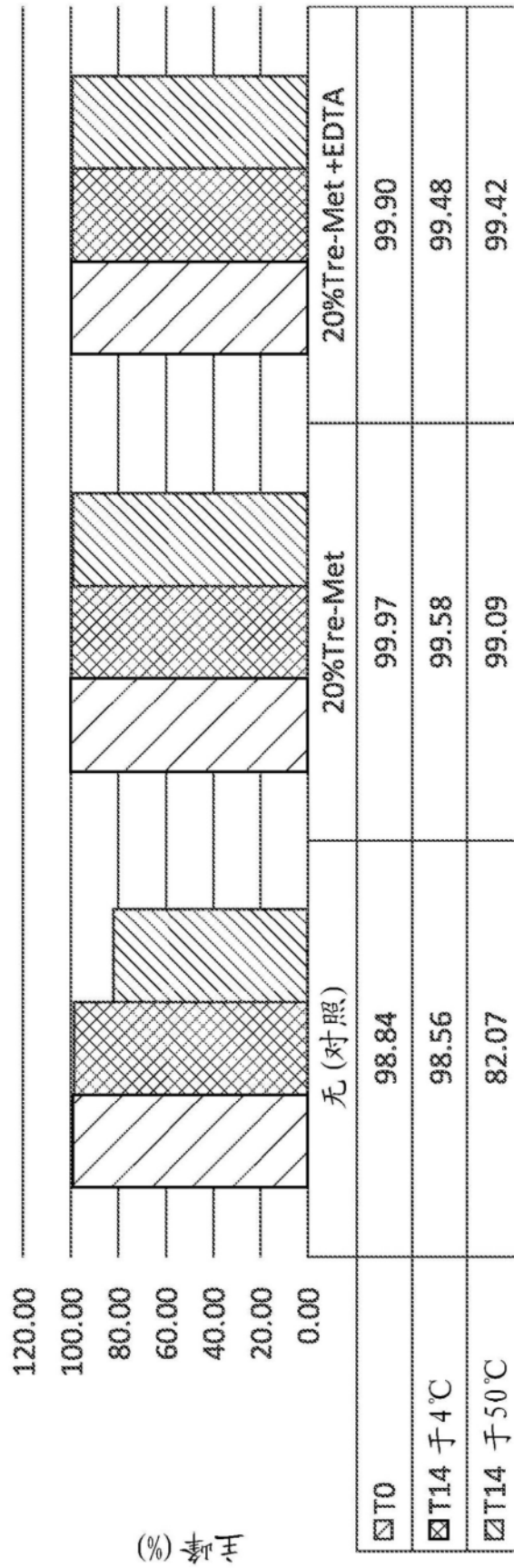


图5

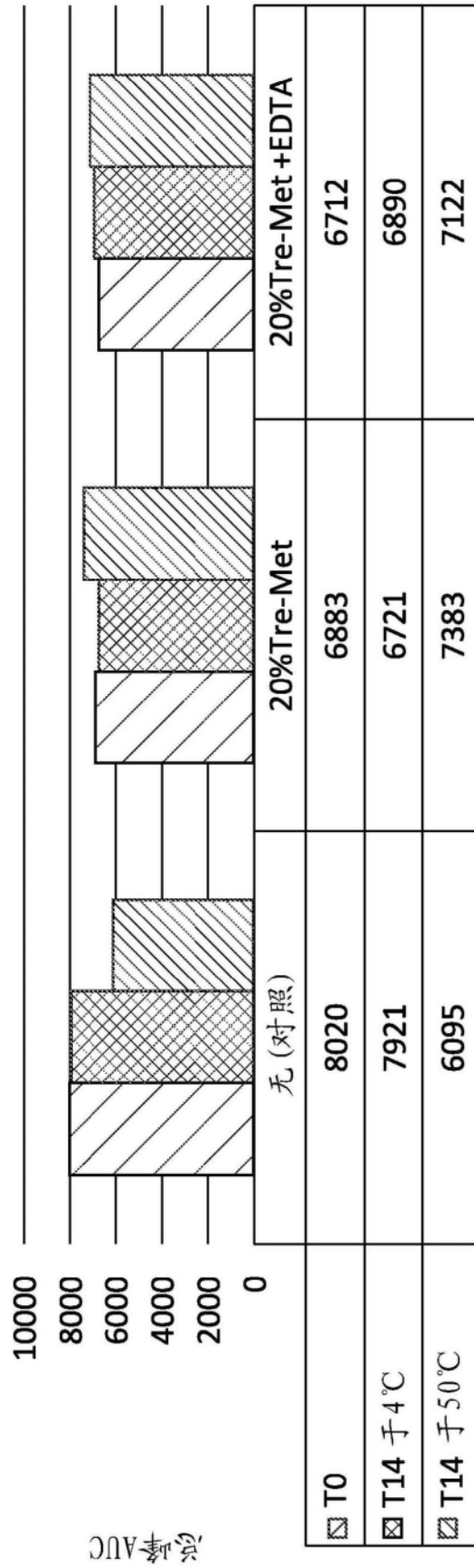


图6

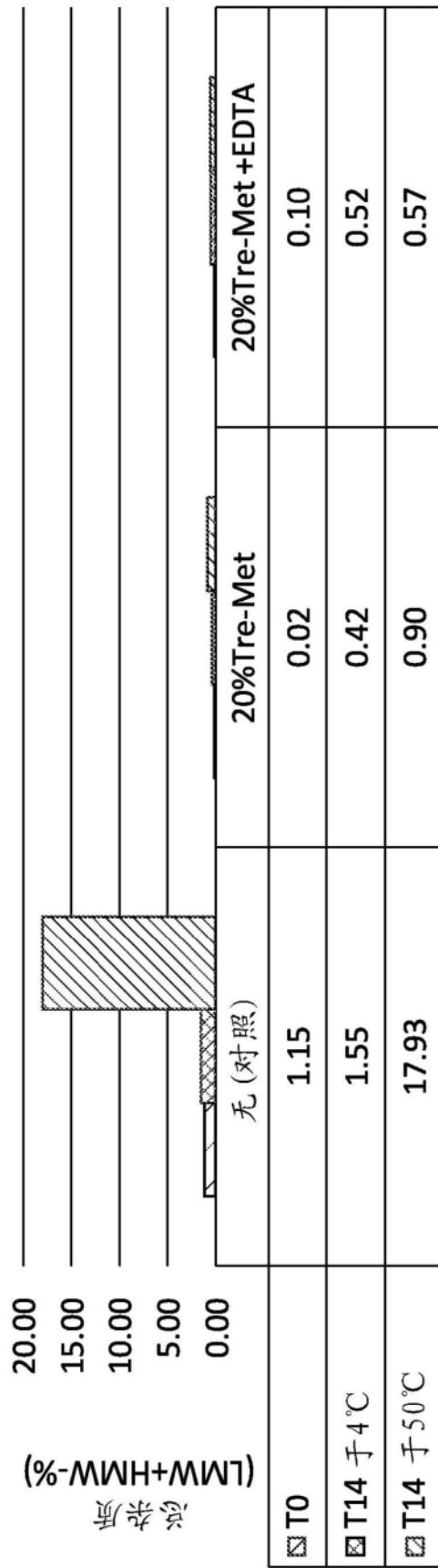


图7

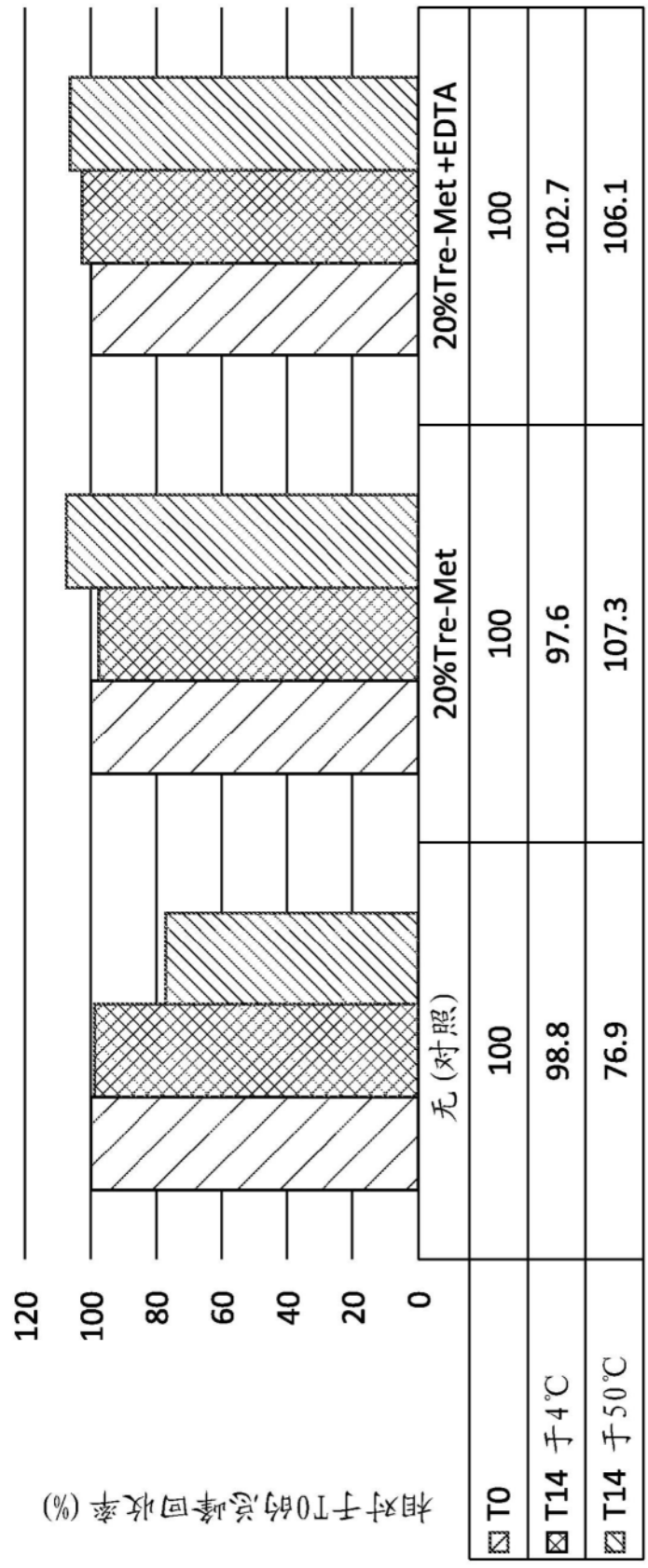


图8

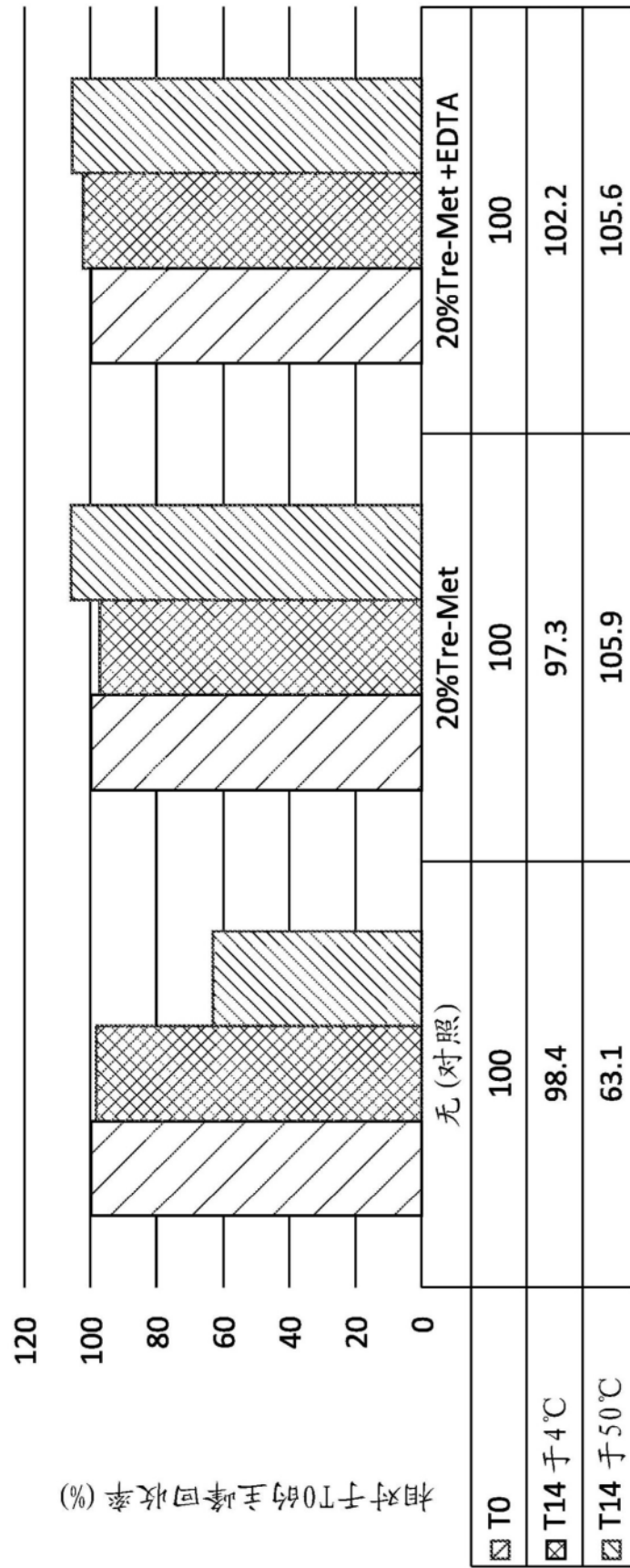


图9

NI-0401 -迭代#3未透析的-
T0&T14 Lyo NR凝胶

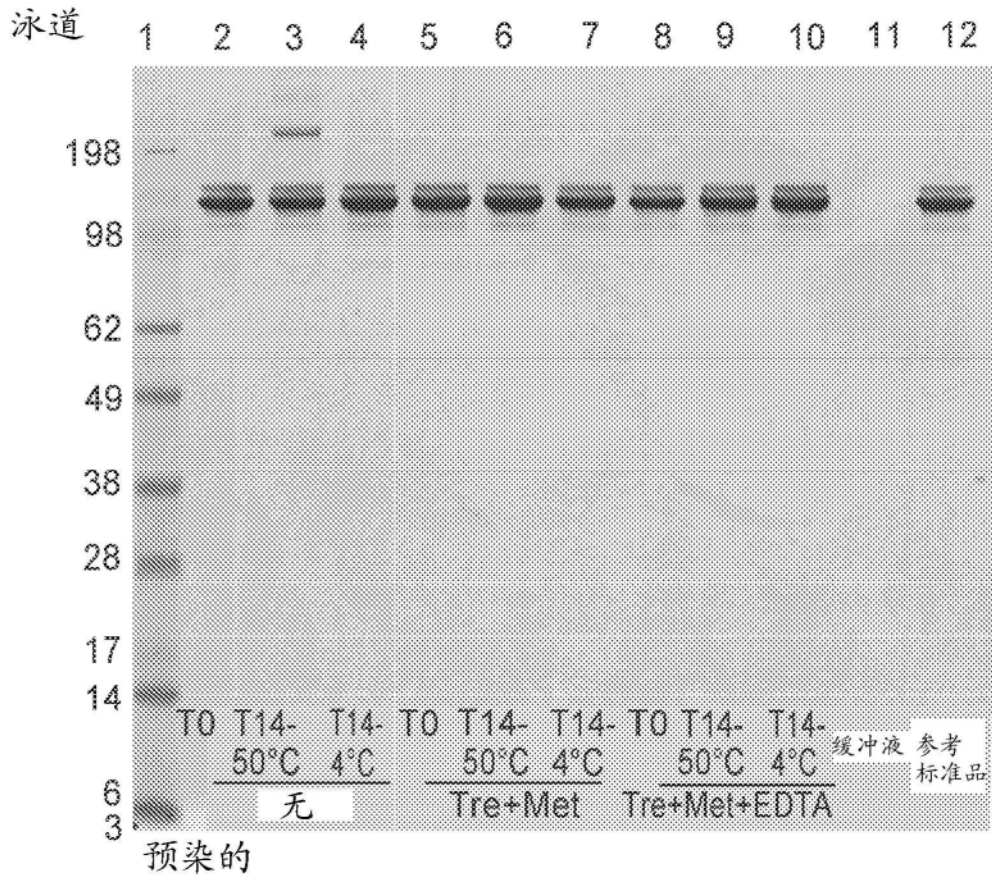


图10

NI-0401 -迭代#3未透析的-
T0&T14 Lyo 还原凝胶

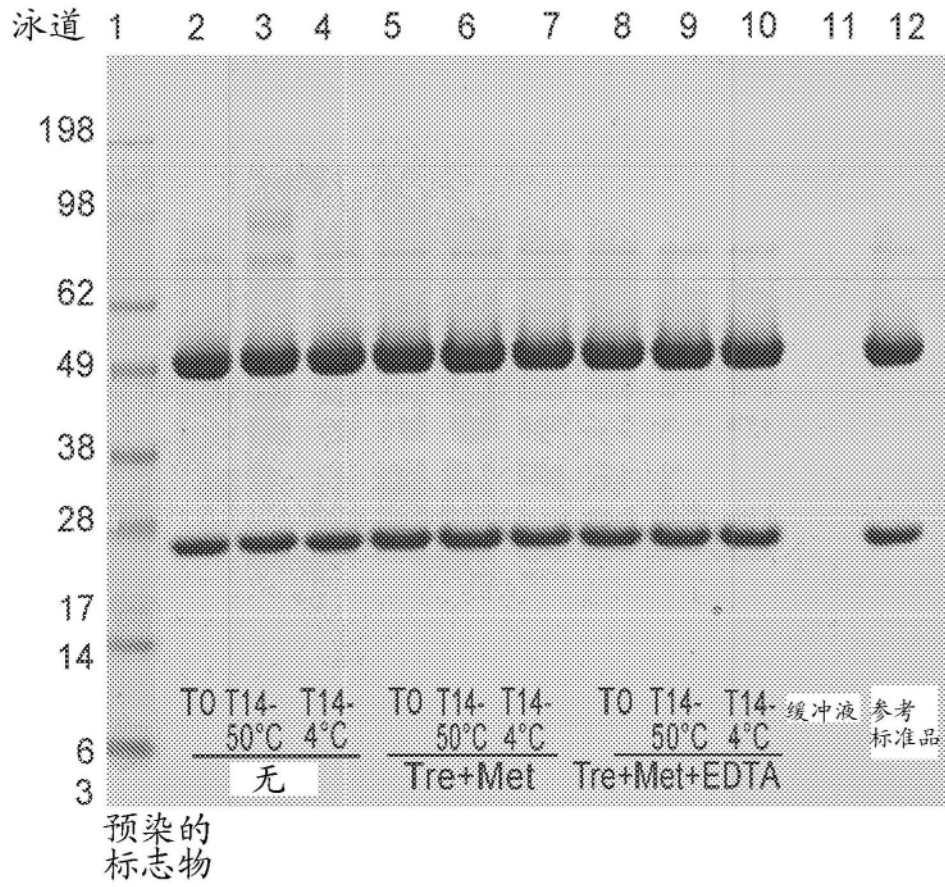


图11

NI-0401 -迭代#3
T0&T14 Lyo-IEF凝胶3-10 pH梯度

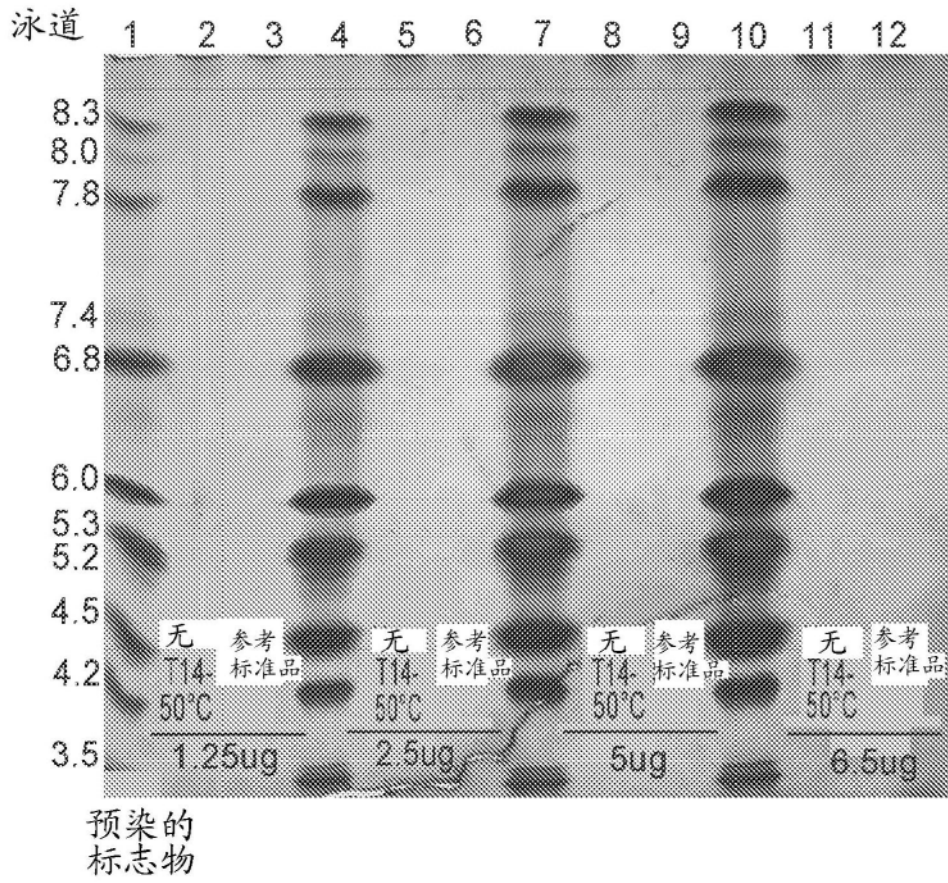


图12

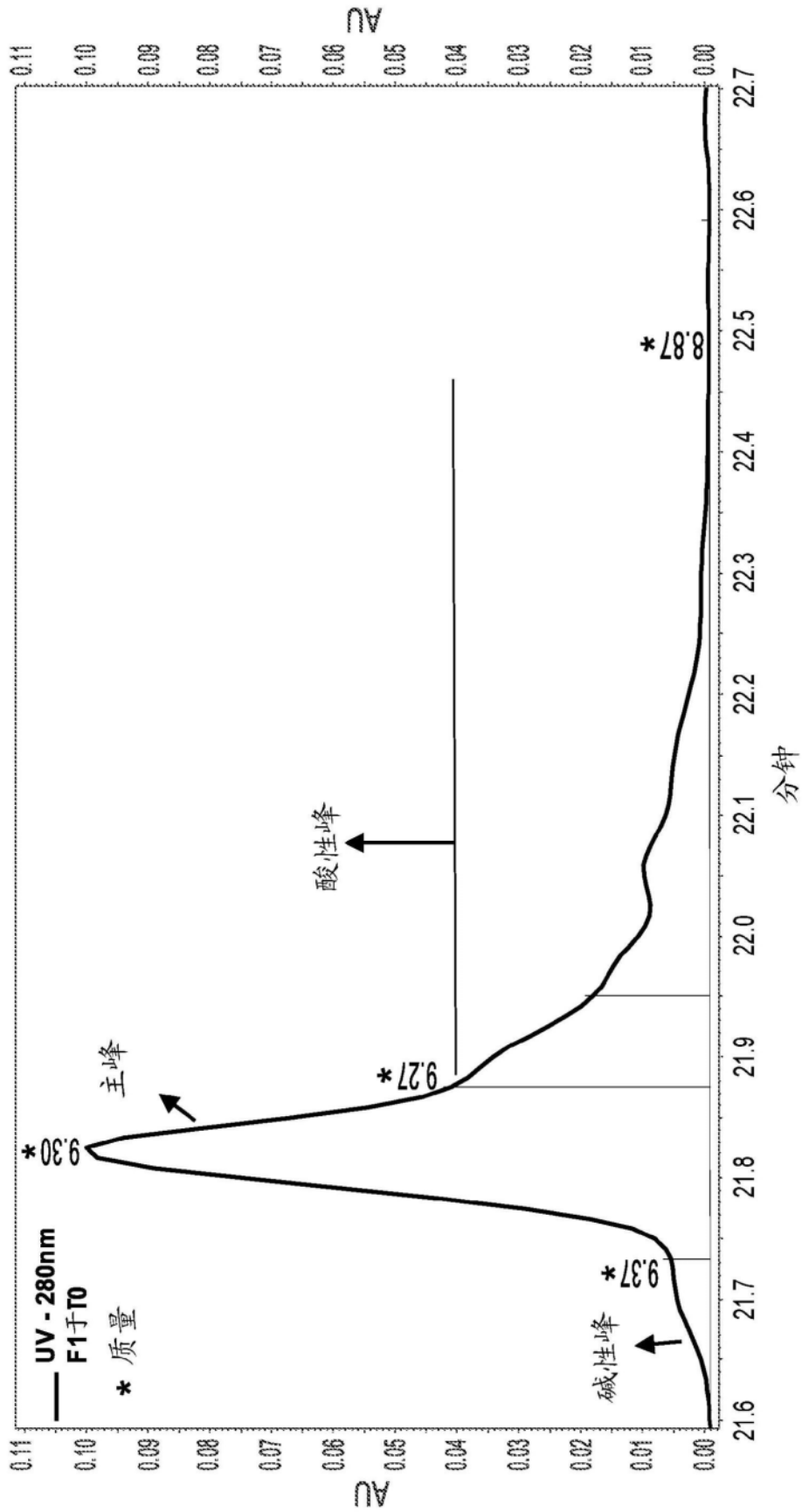


图13

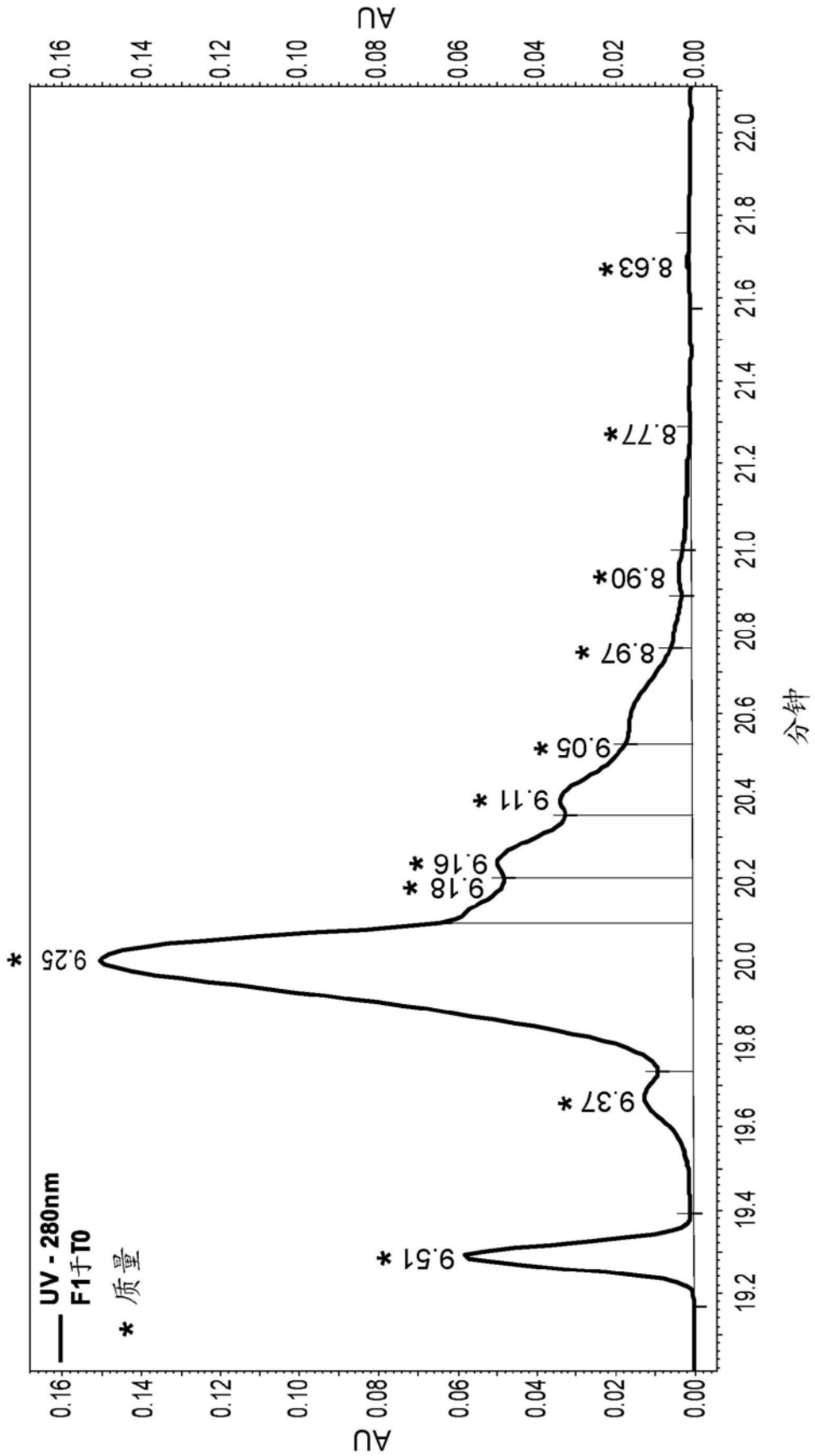


图14

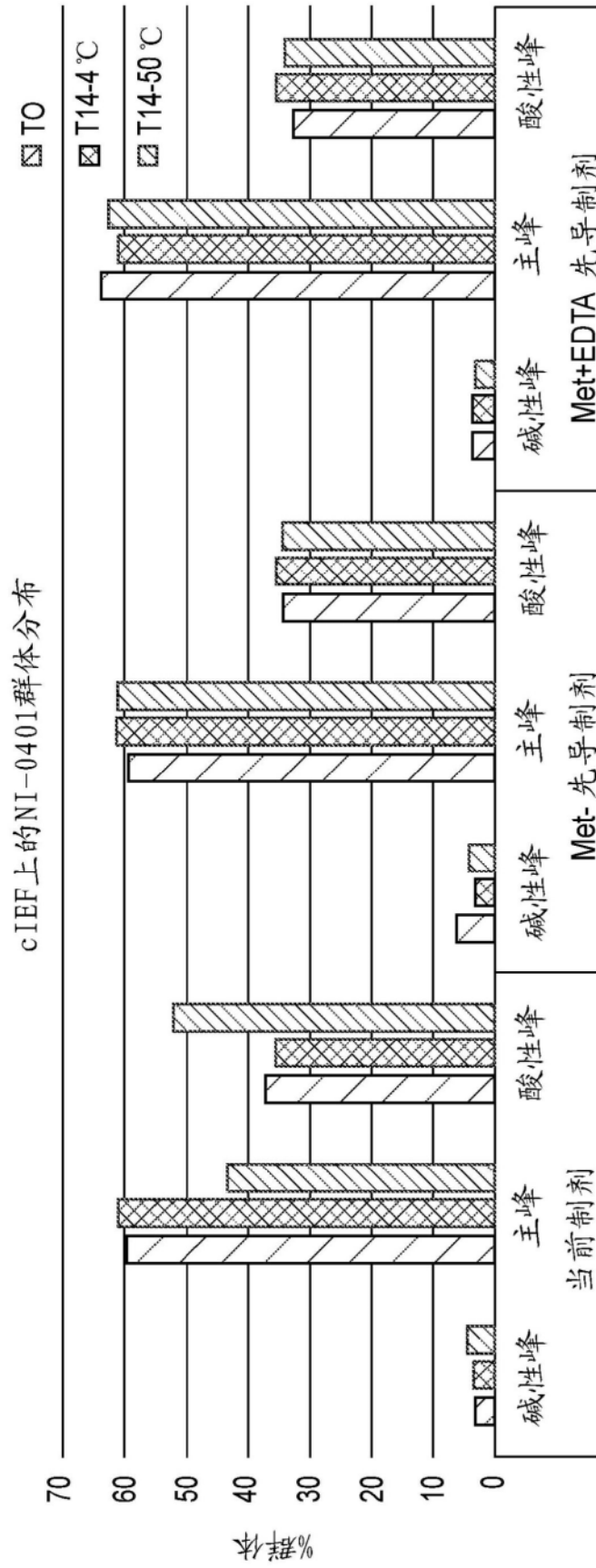


图15

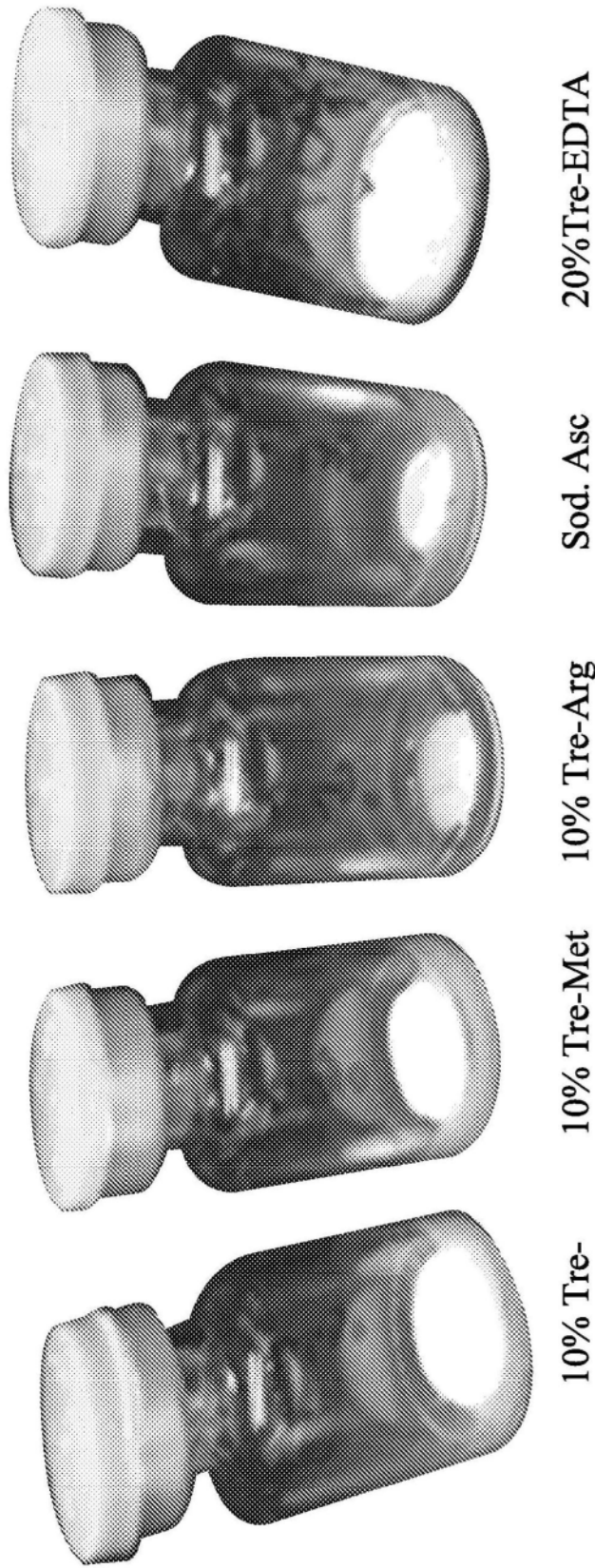


图16

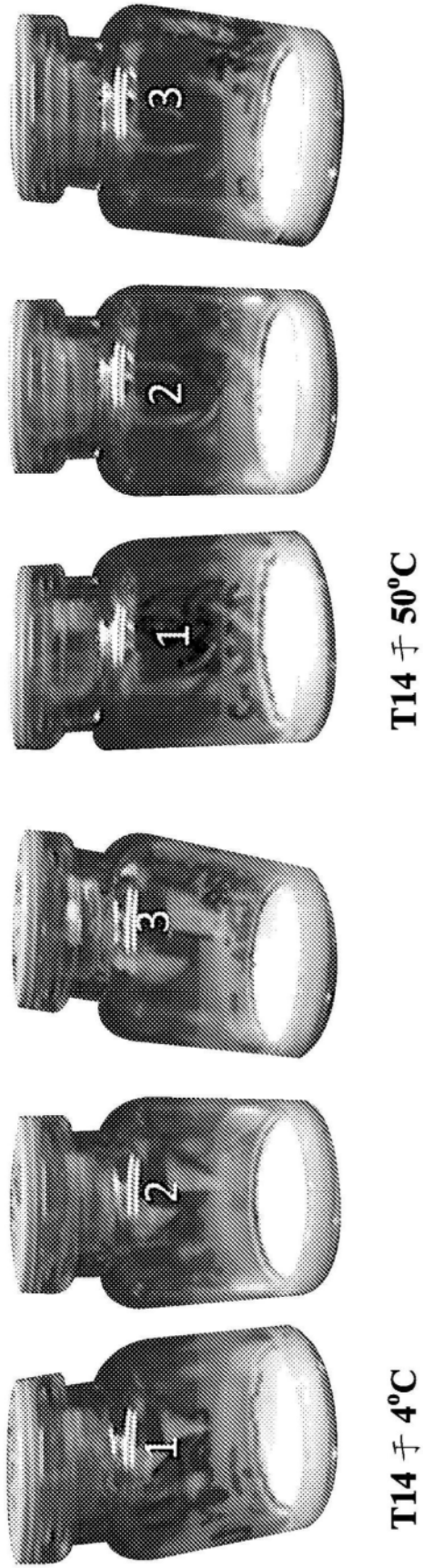
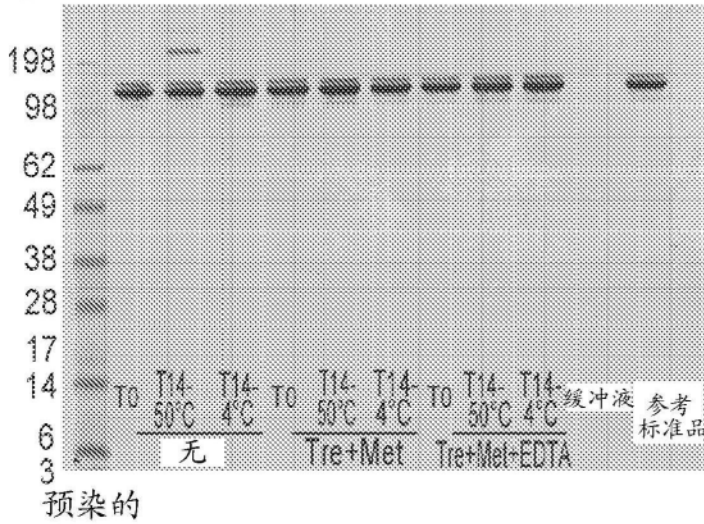


图17

A 泳道 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



泳道 1=标志物
 泳道 2=TO (对照)
 泳道 3=T14-50C (对照)
 泳道 4=T14-4C (对照)
 泳道 5= TO(Tre-Met)
 泳道 6=T14-50C (Tre-Met)
 泳道 7=T14-4C (Tre-Met)
 泳道 8= TO (Tre-Met-EDTA)
 泳道 9=T14-50C (Tre-Met-EDTA)
 泳道 10=T14-4C (Tre-Met-EDTA)
 泳道 11= 缓冲液
 泳道 12 = 参考标准品

B 泳道 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

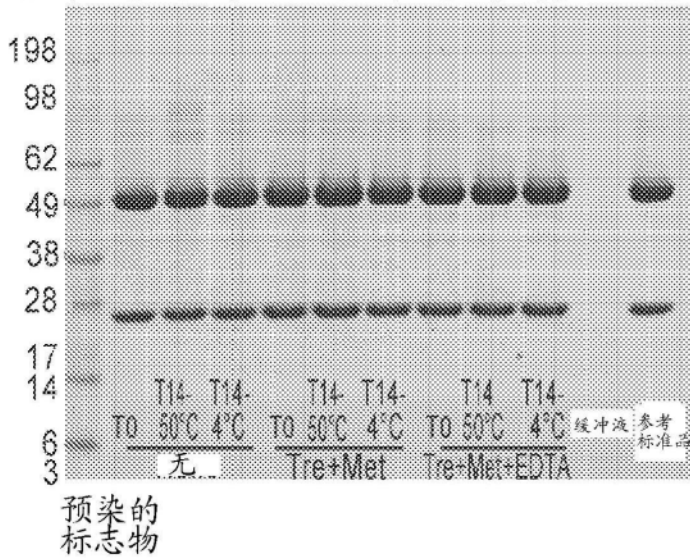


图19

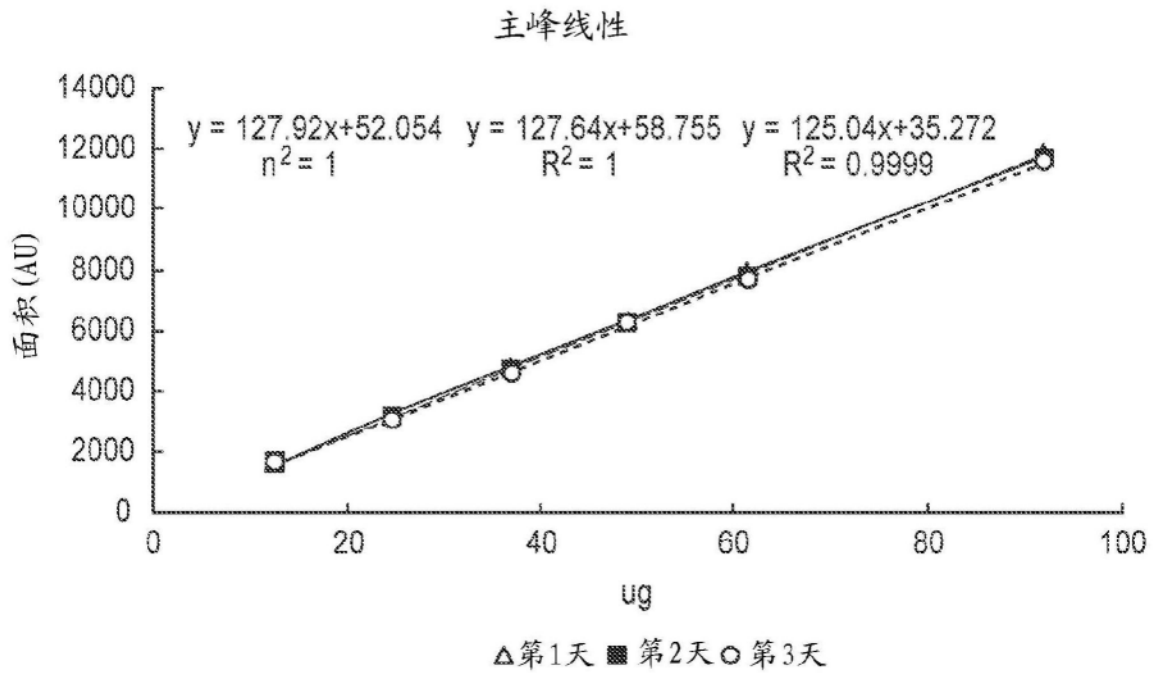


图20

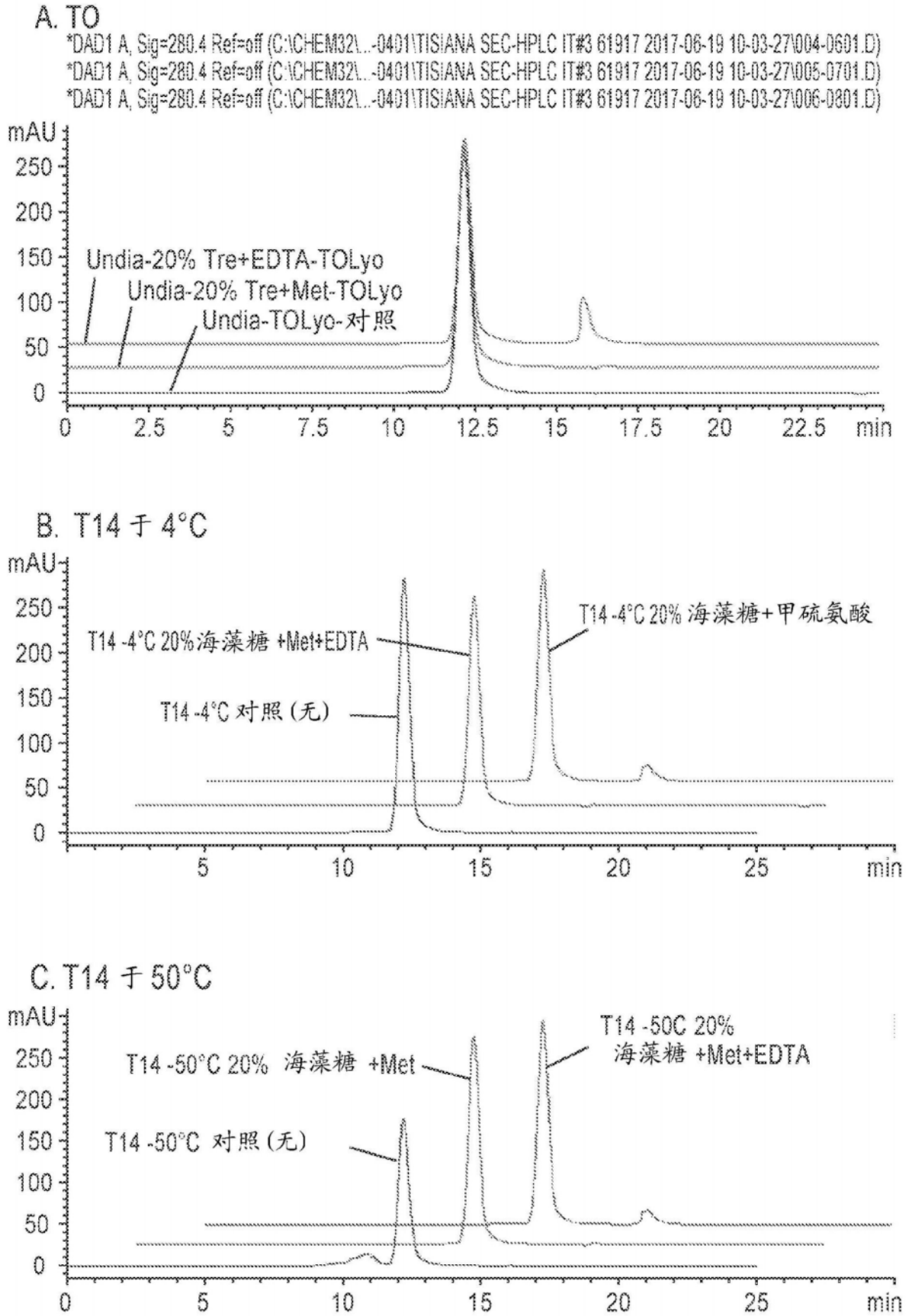
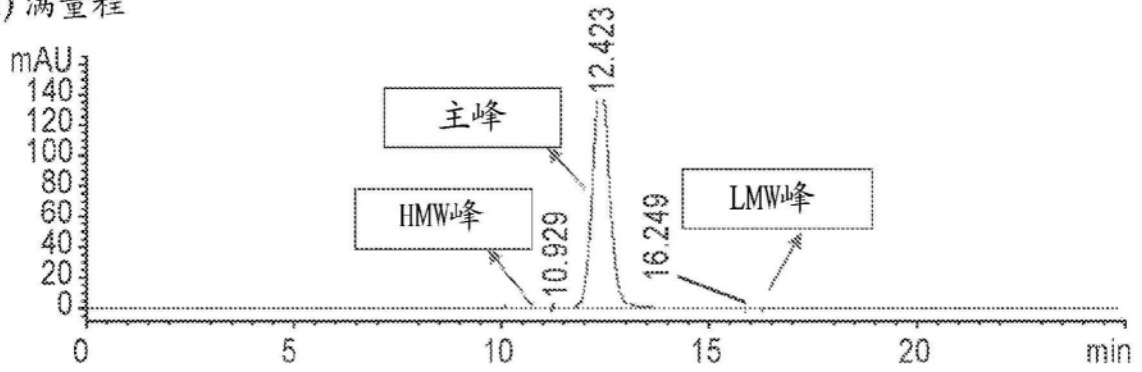
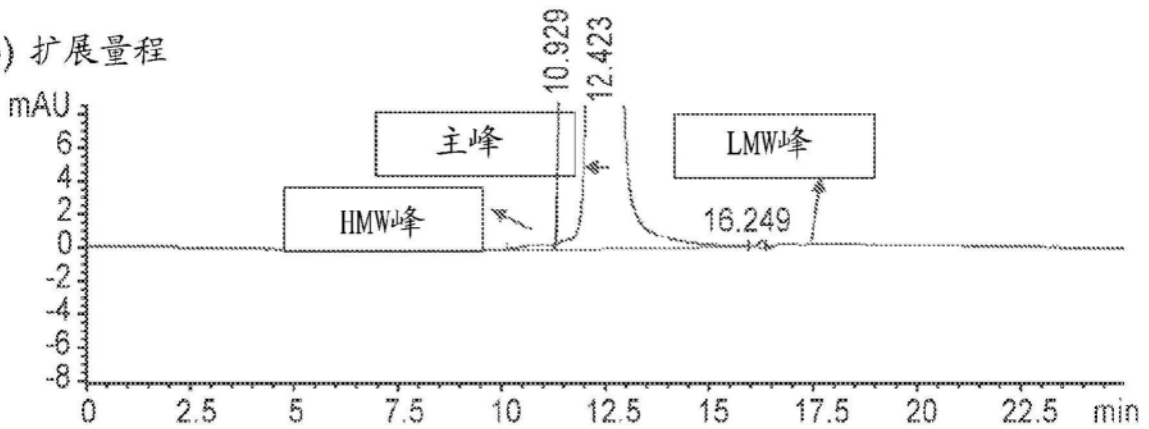


图21

a) 满量程



b) 扩展量程



c) 叠加

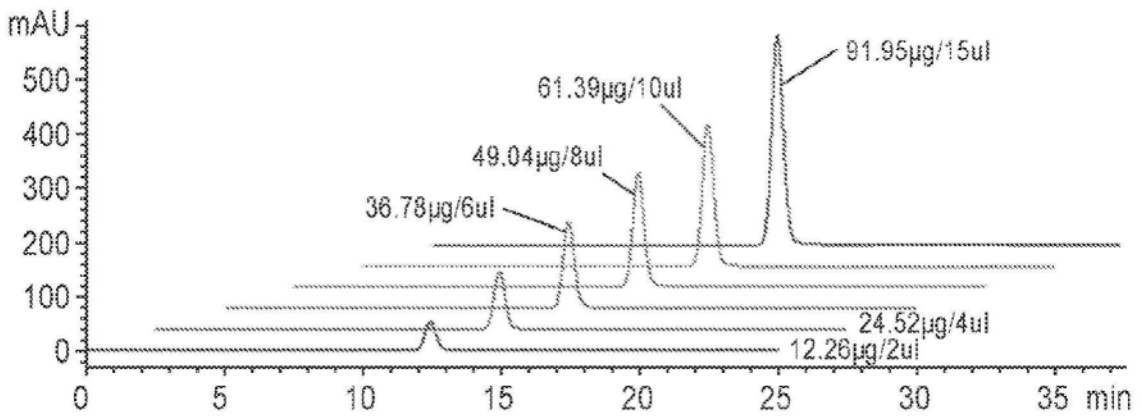
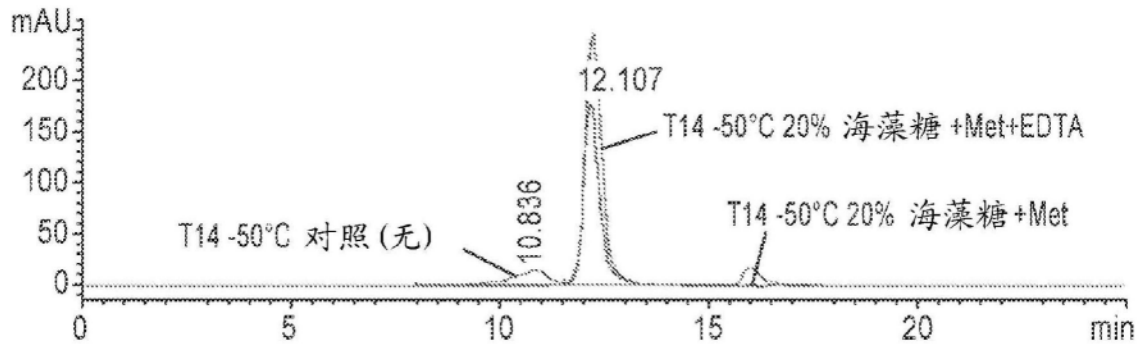


图22

A



B

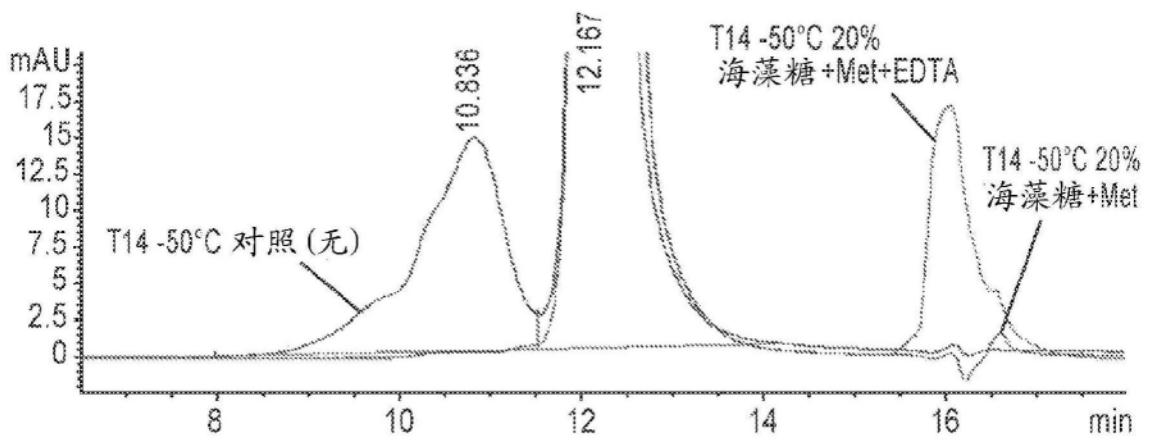


图23

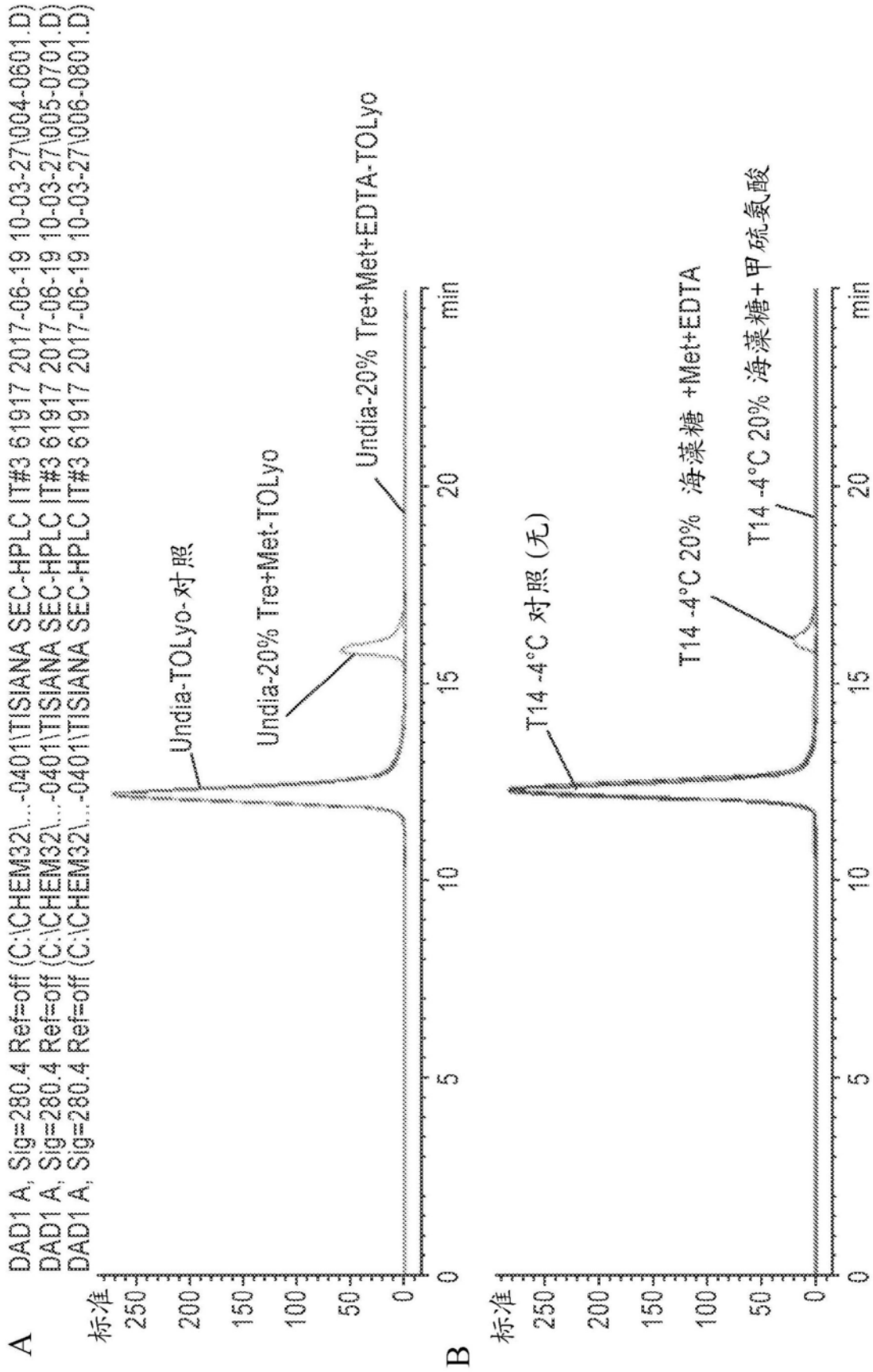


图24

*DAD1 A, Sig=280.4 Ref=off (C:\CHEM32\...-0401\TISIANA SEC-HPLC IT#3 61917 2017-06-19 10-03-27\004-0601.D)
*DAD1 A, Sig=280.4 Ref=off (C:\CHEM32\...-0401\TISIANA SEC-HPLC IT#3 61917 2017-06-19 10-03-27\005-0701.D)
*DAD1 A, Sig=280.4 Ref=off (C:\CHEM32\...-0401\TISIANA SEC-HPLC IT#3 61917 2017-06-19 10-03-27\006-0801.D)

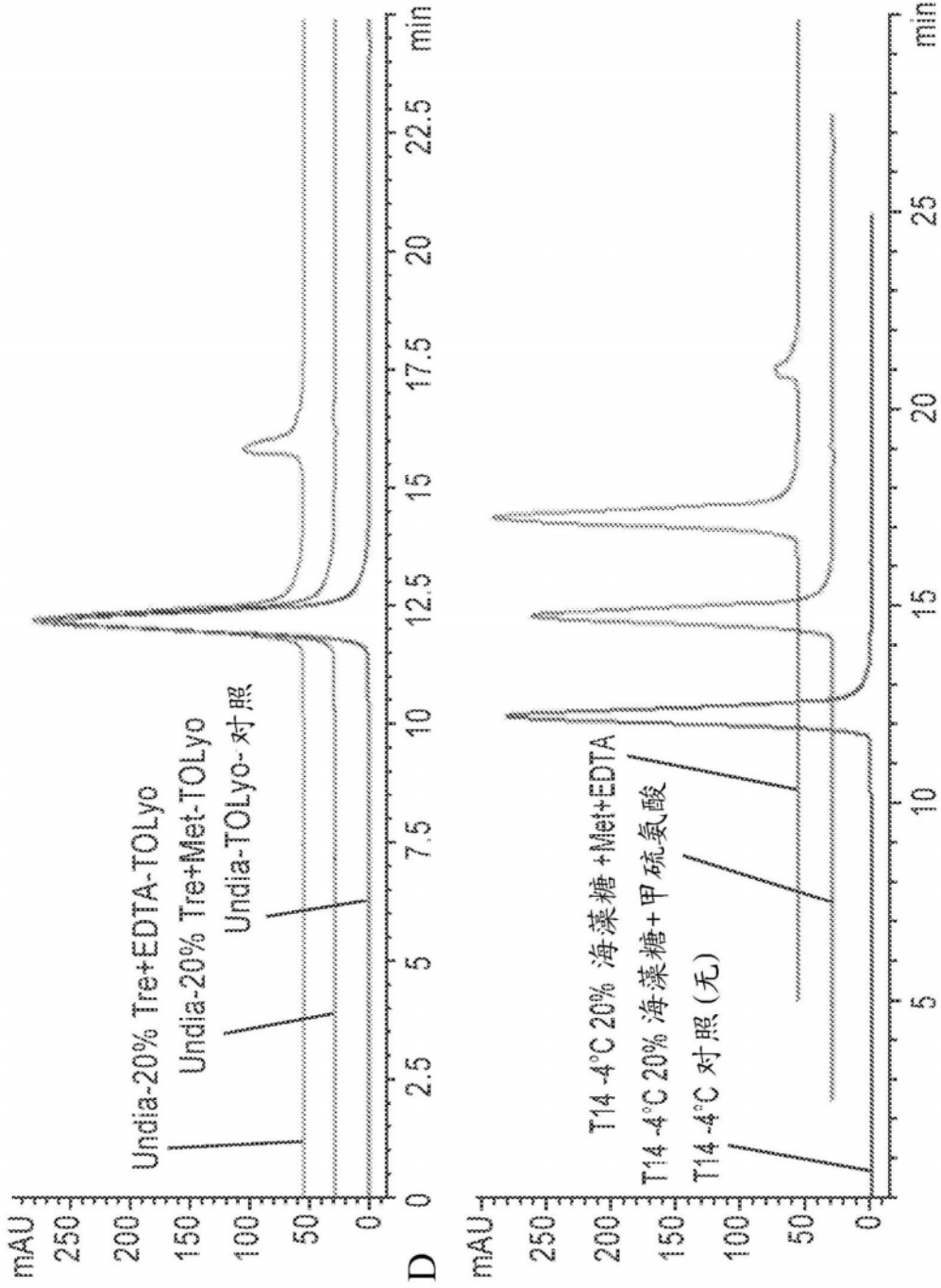


图24续

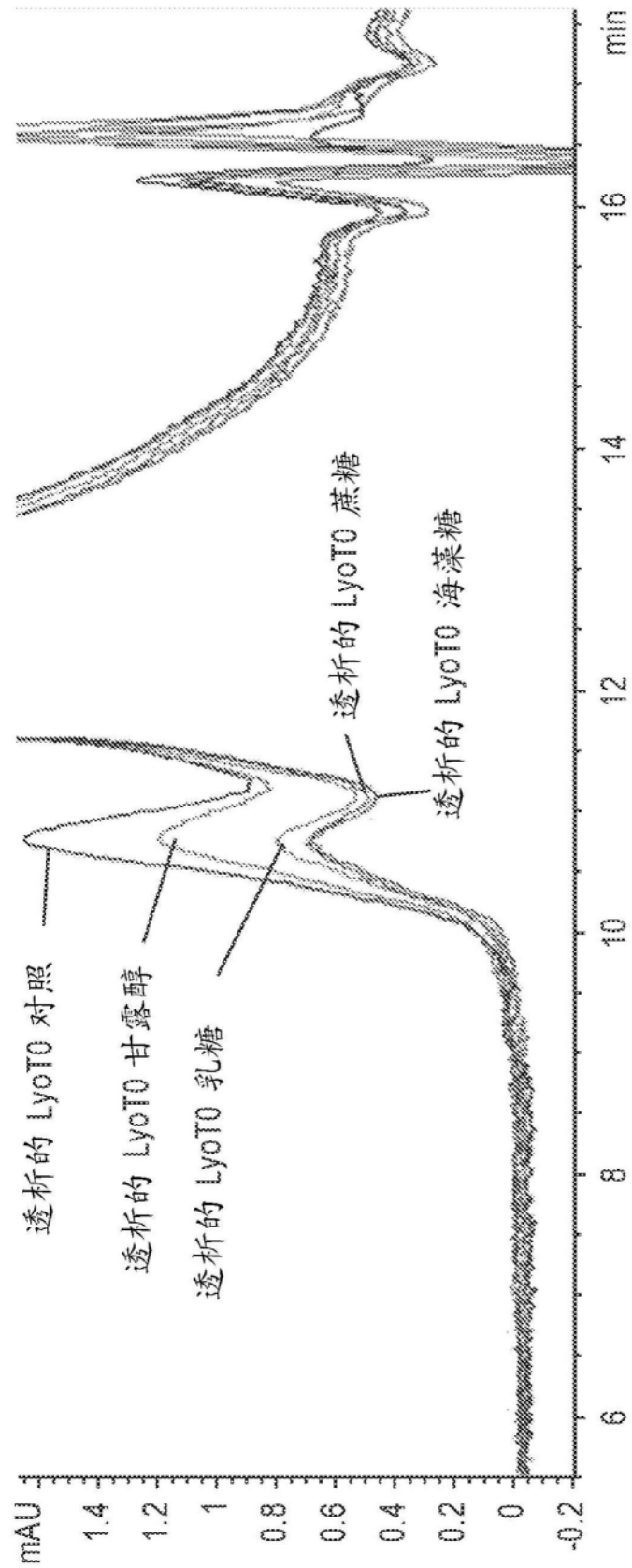


图25

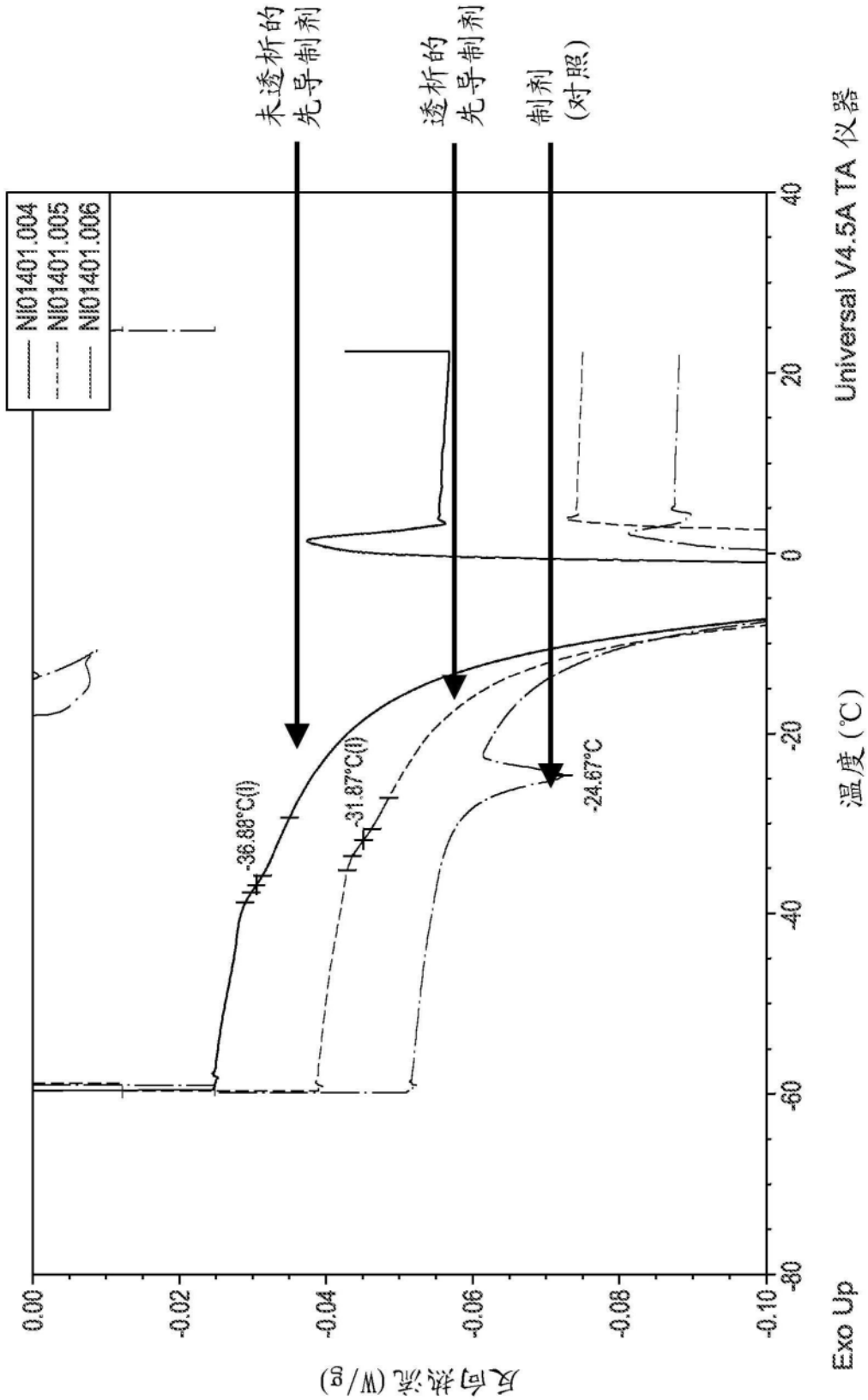


图26

●	Ab1	介质中冷冻的Abs
■	Ab2	
▲	Ab3	
⊖	Ab4	安慰剂
⊖	Ab5	
△	Ab6	
⊖	Ab7	
⊖	Ab8	
△	Ab9	
○	Ab10	冻干的Abs方法1 (保持在-80℃下)
□	Ab11	
△	Ab12	
●	Ab13	冻干的Abs方法2 (保持在50℃下14d)
■	Ab14	
▲	Ab15	
✱	ms 抗 -hu CD3 APC	对照
⊖	仅第二 (抗 -Hu IgFc APC)	
⊖	Hu IgFc 和抗 -Hu IgGFc APC	

图27

用每一NI-0401小瓶试剂染色的细胞/
用抗人IgGFC APC检测(红色)

与用人IgFc染色的细胞叠加/
用抗人IgGFC APC检测(蓝色)

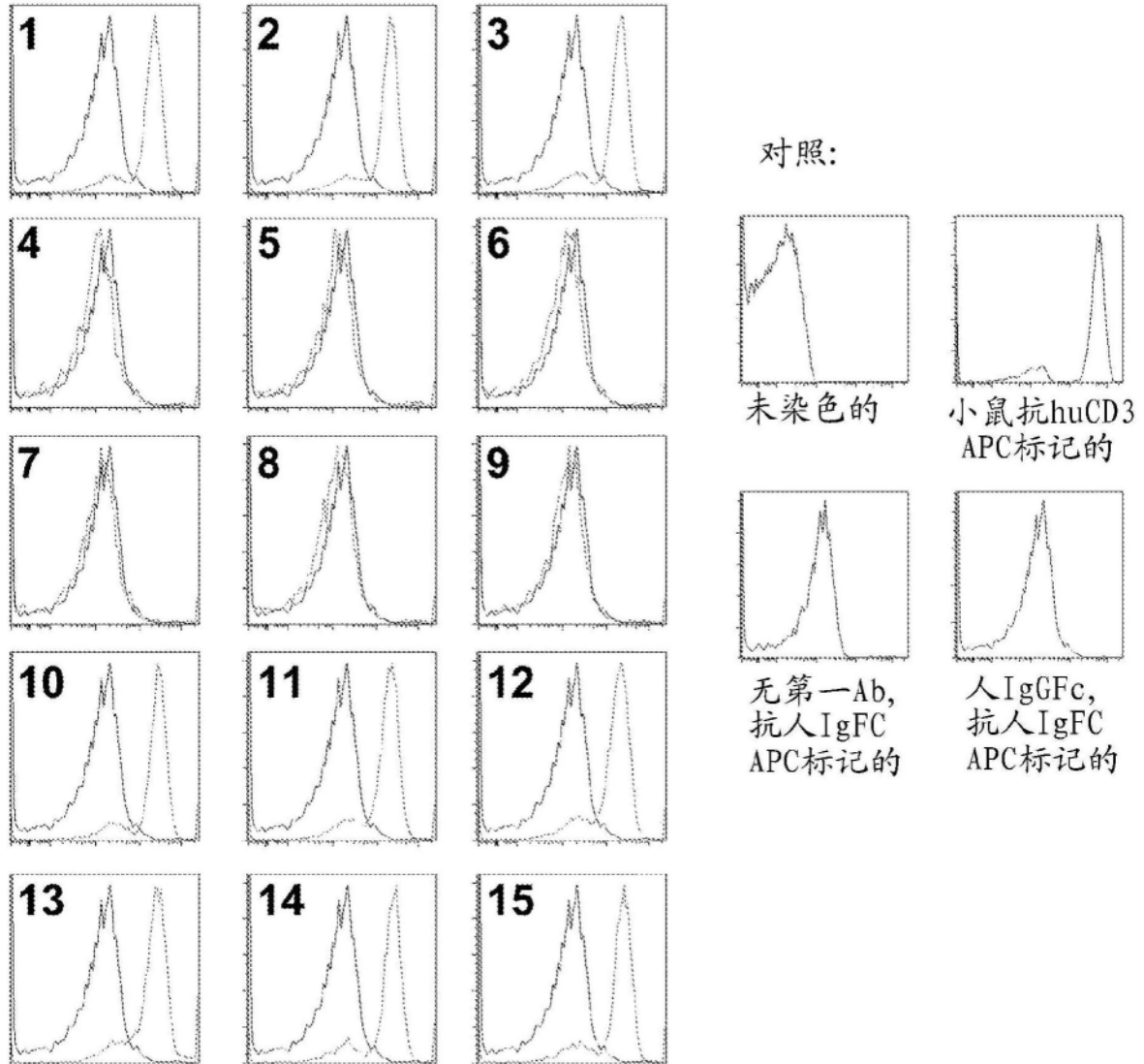


图28

测试NI-0401 Ab试剂(1-15)的系列四倍稀释液其结合PBMC(以 2.5×10^{-5} /样品)的能力

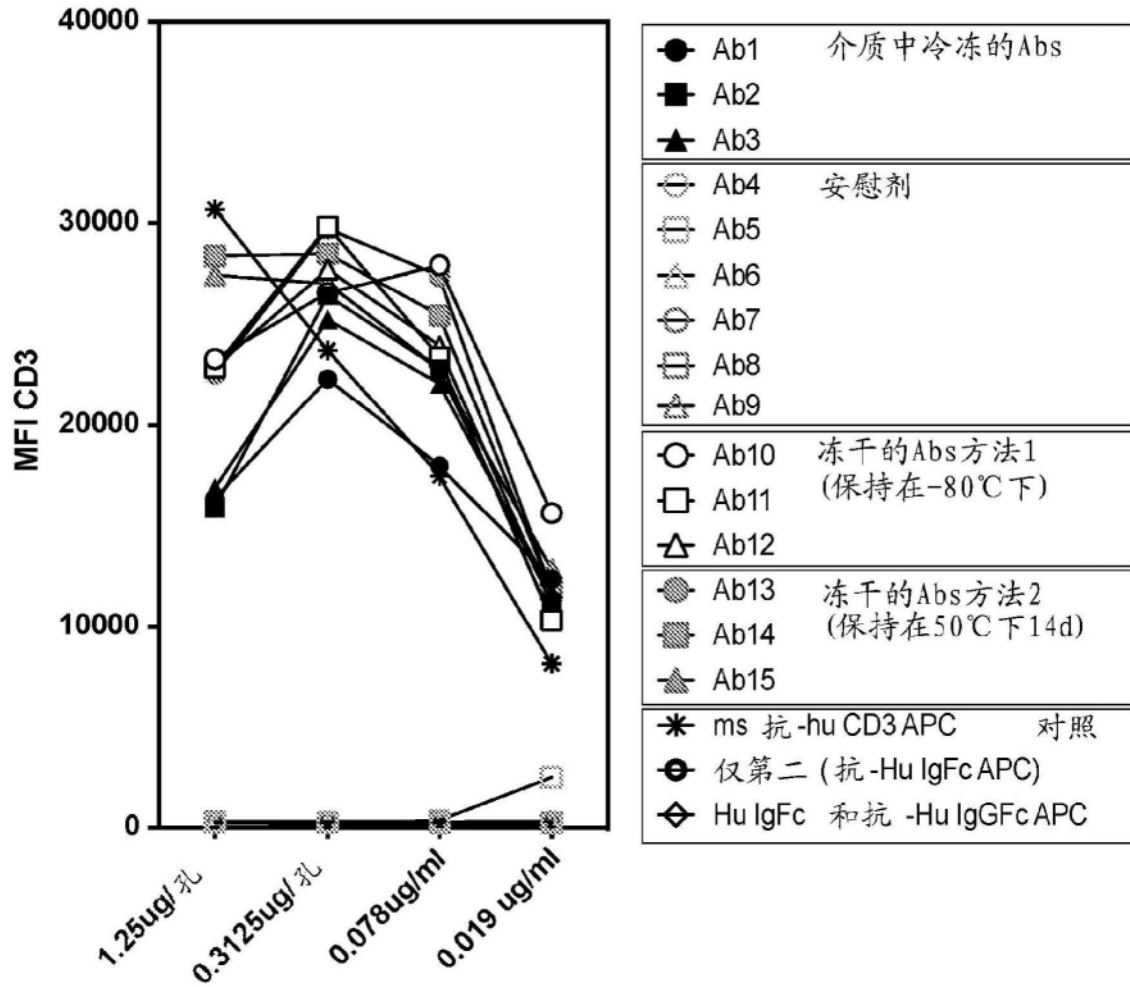
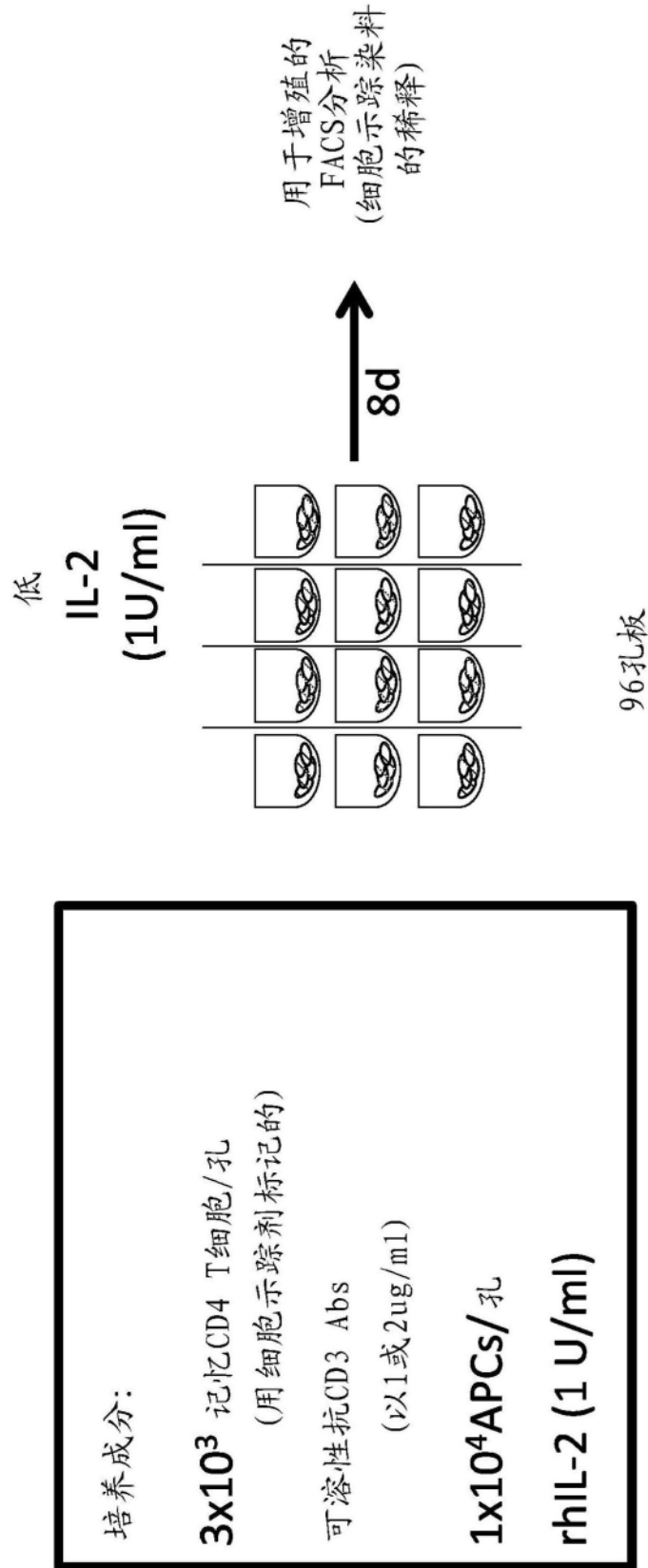


图29



APC=辐照的、T细胞
耗尽的自体PBMC

图30

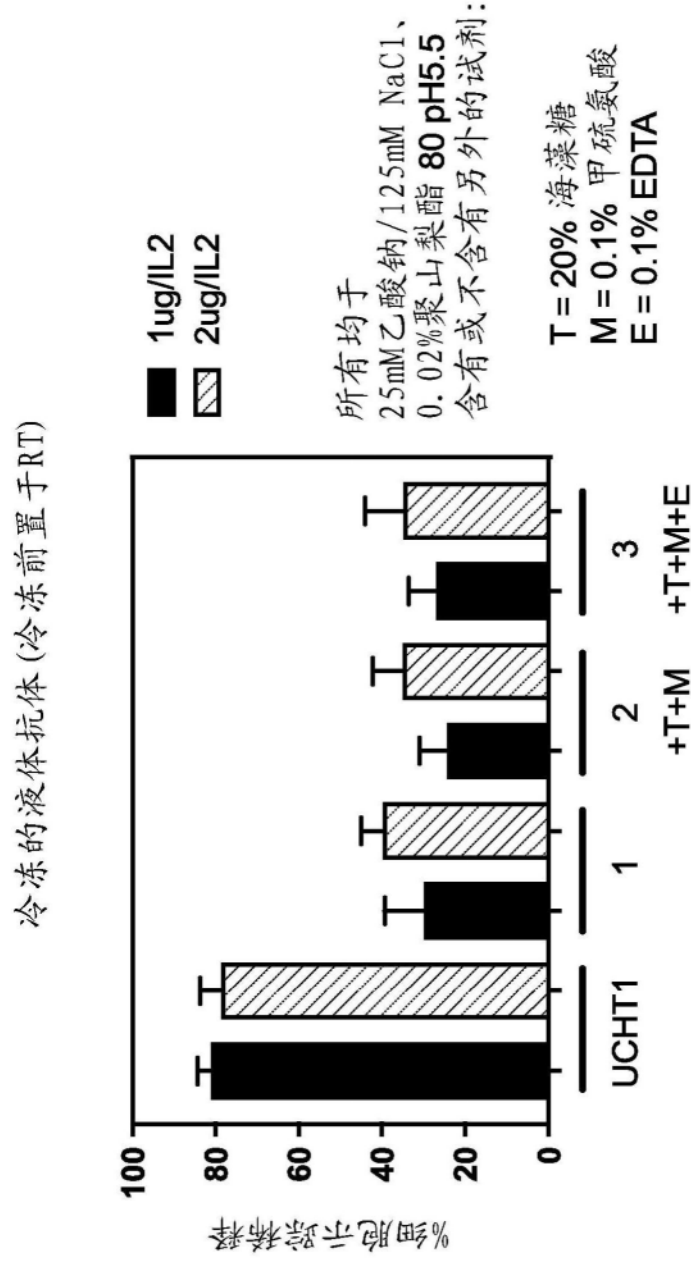


图31

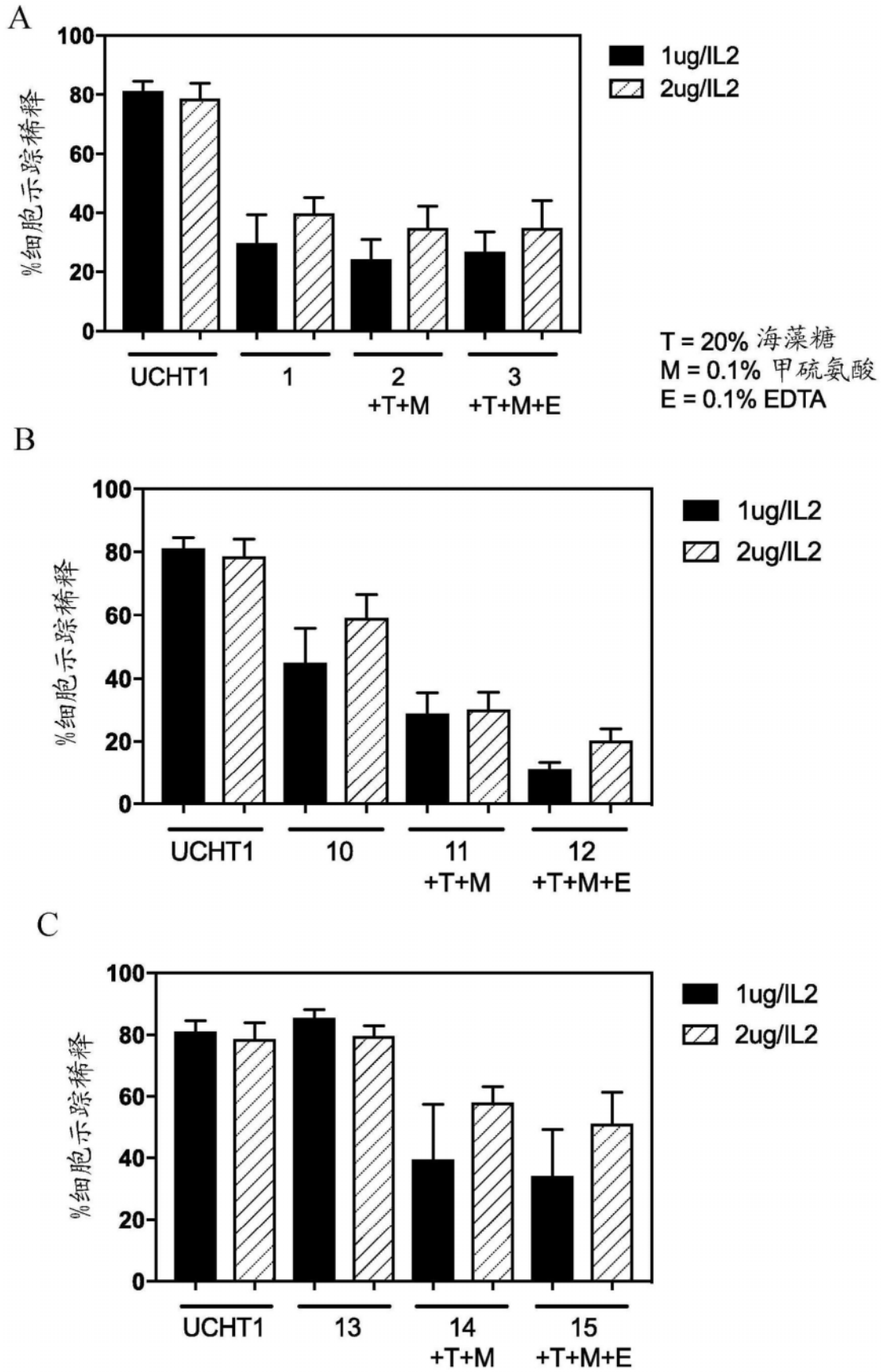
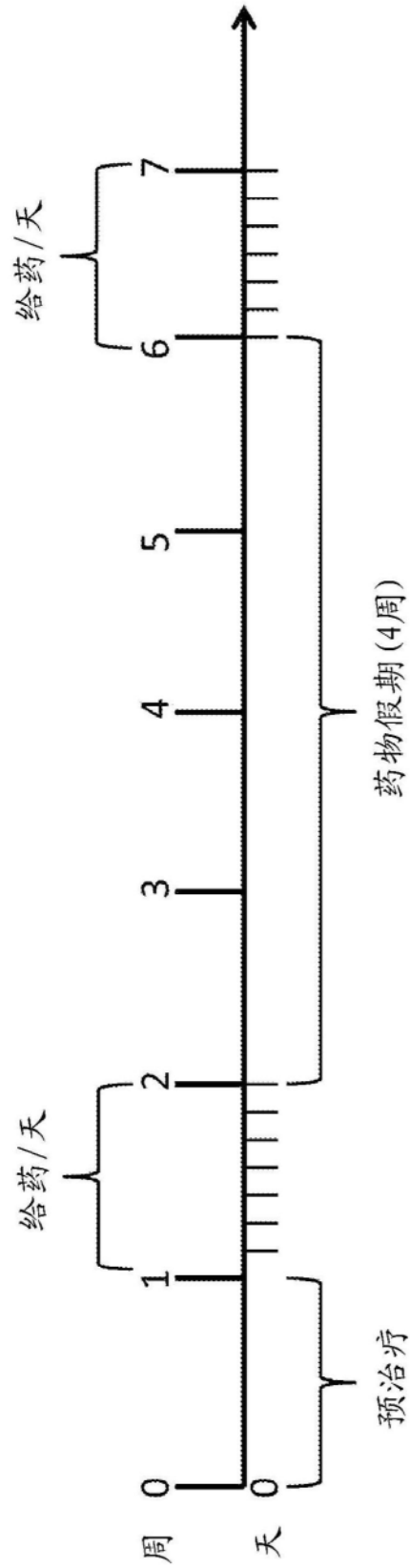


图32

给药方案



给药方案和药物假期周期可以重复

图33

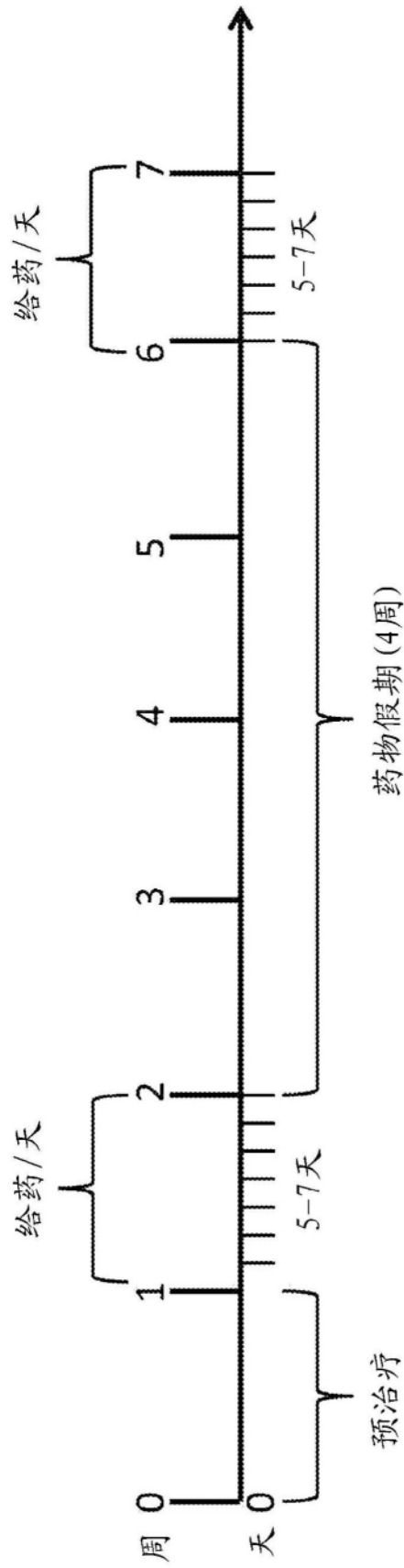


图34

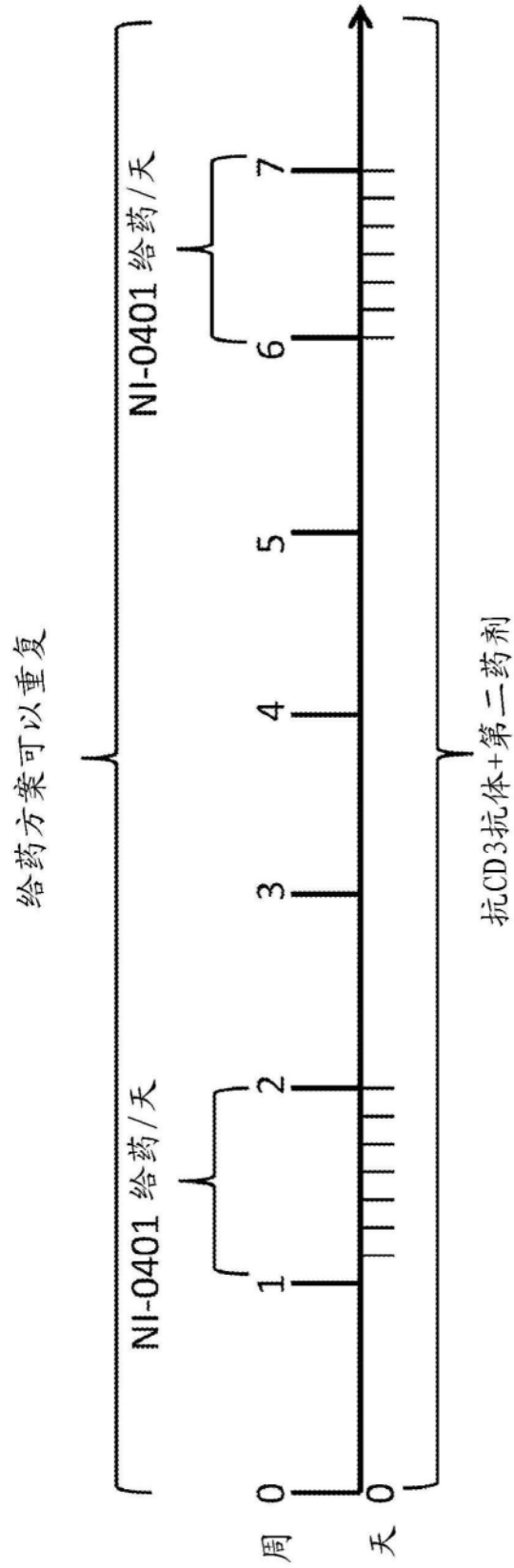


图35

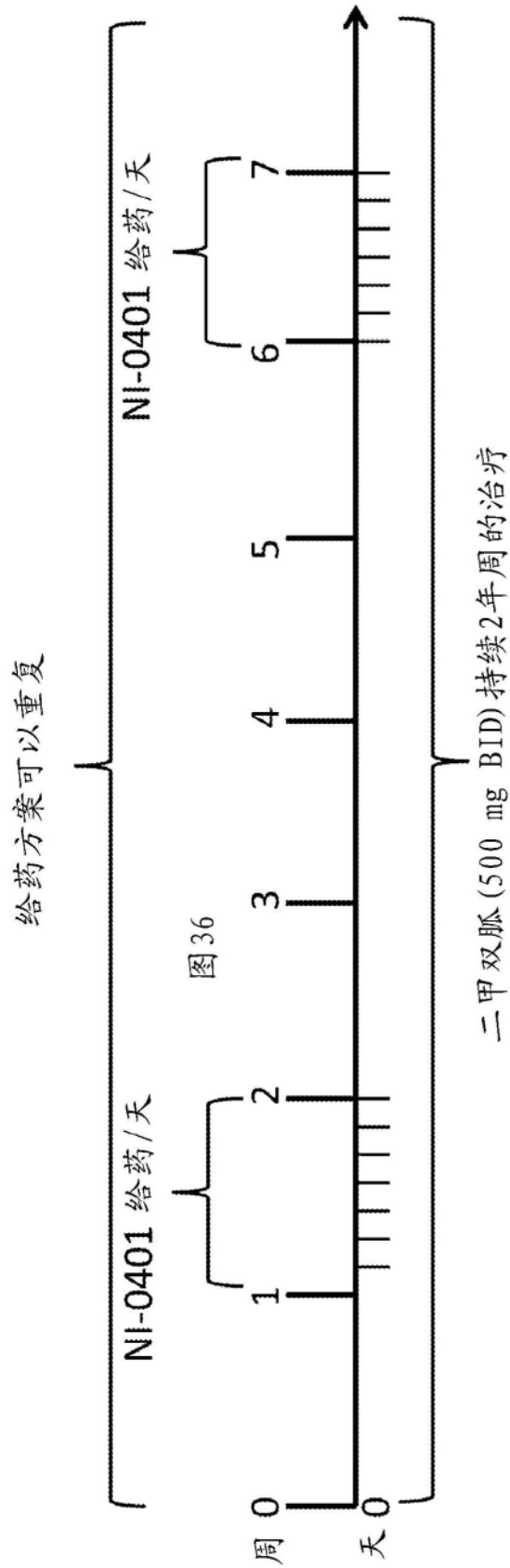


图36