(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114760988 A
(43)申请公布日 2022.07.15

(21)申请号 202080082789.3
(22)申请日 2020.11.27
(30)优先权数据
62/940,966 2019.11.27 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2020/053026 2020.11.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/105694 EN 2021.06.03
(71)申请人 拜斯科技术开发有限公司
地址 英国剑桥
(72)发明人 G·贝内特 L·曼克
(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
专利代理师 张世俊
(51)Int.Cl.
A61K 9/00(2006.01)
A61K 9/08(2006.01)
A61K 47/14(2006.01)
A61K 47/18(2006.01)
A61K 47/26(2006.01)

权利要求书1页 说明书42页
序列表2页

(54)发明名称

对EphA2具有特异性的双环肽配体和其用途

(57)摘要

本发明涉及双环毒素结合物BT5528或其药学上可接受的盐或其药物组合物,和其用途。

CN 114760988 A

1.一种药物组合物,所述药物组合物包含BT5528或其药学上可接受的盐,以及选自缓冲剂、填充剂或增量剂或粘合剂和表面活性剂的药学上可接受的赋形剂或载剂。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述缓冲剂为组氨酸盐酸盐。

3.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述填充剂或增量剂或粘合剂为蔗糖。

4.根据权利要求1至3中任一权利要求所述的药物组合物,其中所述表面活性剂为聚山梨糖醇-20。

5.根据权利要求1至4中任一权利要求所述的药物组合物,其进一步包含等张性调节剂。

6.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述等张性调节剂包含右旋糖。

7.根据权利要求1至6中任一权利要求所述的药物组合物,其为呈冻干粉末形式的固体药物组合物。

8.根据权利要求1至6中任一权利要求所述的药物组合物,其为进一步包含水的液体药物组合物。

9.根据权利要求1至8中任一权利要求所述的药物组合物,其包含:

BT5528或其药学上可接受的盐;

每mg BT5528或其药学上可接受的约1.31-2.62mg组氨酸盐酸盐;

每mg BT5528或其药学上可接受的约15-30mg蔗糖;和

每mg BT5528或其药学上可接受的约0.05-0.1mg聚山梨醇酯20。

10.根据权利要求9所述的药物组合物,其包含:

约21.2mg BT5528或其药学上可接受的盐;

每mg BT5528或其药学上可接受的约55.5mg组氨酸盐酸盐;

每mg BT5528或其药学上可接受的约636mg蔗糖;和

每mg BT5528或其药学上可接受的约1.06-2.12mg聚山梨醇酯20。

11.根据权利要求8所述的药物组合物,其包含:

约2-4mg/mL BT5528或其药学上可接受的盐;

约5.25mg/mL组氨酸盐酸盐;

约60mg/mL蔗糖;和

约0.1-0.2mg/mL聚山梨醇酯20。

12.一种治疗患者中与EphA2表达相关的晚期实体肿瘤恶性肿瘤的方法,其包含向所述患者静脉内施用根据权利要求1至11中任一权利要求所述的药物组合物。

13.根据权利要求12所述的方法,其中所述与EphA2表达相关的晚期实体肿瘤恶性肿瘤选自非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、三阴性乳腺癌(TNBC)、胃癌/上消化道(GI)癌、胰腺癌和尿道上皮癌。

14.根据权利要求12或13所述的方法,其中所述药物组合物每7天施用一次。

15.根据权利要求12至14中任一权利要求所述的方法,其中所述药物组合物以约2.2、4.4、7.3、11、14.6或19.4mg/m^2的剂量施用。

16.根据权利要求12至15中任一权利要求所述的方法,其中所述药物组合物经由约60分钟的IV输注施用。

17.根据权利要求12至15中任一权利要求所述的方法,其进一步包含施用纳武单抗。

对EphA2具有特异性的双环肽配体和其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年11月27日提交的美国临时专利申请序号62/940,966的优先权，其全部内容以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及双环毒素结合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物。本发明还提供双环毒素结合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的用途，其用于预防或治疗以患病组织中EphA2的过表达为特征的疾病、病症或病况。

背景技术

[0004] 环肽能够以高亲和力和靶标特异性结合蛋白质靶标，其因此是用于治疗剂开发的有吸引力的分子类别。事实上，几种环肽已成功应用于临床，例如抗细菌肽万古霉素、免疫抑制剂环孢霉素或抗癌药物奥曲肽(德里杰斯(Driggers)等人(2008)，自然评论药物发现(Nat Rev Drug Discov)7(7)，608-24)。良好的结合特性源于肽与靶标之间形成的相对较大的相互作用表面以及环状结构的构象灵活性降低。通常，大环化合物与数百平方埃的表面结合，例如环肽CXCR4拮抗剂CVX15(400 $Å^2$;吴(Wu)等人(2007)，科学(Science)330，1066-71)、一种具有与整合素αVb3结合的Arg-Gly-Asp基序的环肽(355 $Å^2$)(熊(Xiong)等人(2002)，科学296(5565)，151-5)或与尿激酶型纤溶酶原激活剂结合的环肽抑制剂upain-1(603 $Å^2$;赵(Zhao)等人(2007)，结构生物学杂志(J Struct Biol)160(1)，1-10)。

[0005] 肽大环化合物由于它们的环状构型而不如线性肽灵活，导致结合至靶标时的熵损失更小并导致结合亲和力更高。降低的灵活性还导致锁定靶标特异性构象，与线性肽相比增加了结合特异性。这种作用已通过基质金属蛋白酶8(MMP-8)的强效和选择性抑制剂来证明，当所述抑制剂的环打开时，它失去了对其它MMP的选择性(查涅(Cherney)等人(1998)，药物化学杂志(J Med Chem)41(11)，1749-51)。通过大环化实现的有利结合特性在具有多于一个肽环的多环肽中更为显著，例如在万古霉素、乳酸链球菌素和放线菌素中。

[0006] 不同的研究团队先前已将具有半胱氨酸残基的多肽与合成分子结构联系起来(肯普(Kemp)和麦克纳马拉(McNamara)(1985)，有机化学杂志(J.Org.Chem)；蒂默曼(Timmerman)等人(2005)，化学生物化学(ChemBioChem))。梅隆(Meloen)和同事使用三(溴甲基)苯和相关分子将多个肽环快速且定量地环化到合成支架上，以模拟蛋白质表面的结构(蒂默曼等人(2005)，化学生物化学)。产生候选药物化合物的方法，其中所述化合物是通过将含有半胱氨酸的多肽连接到分子支架上产生的，例如TATA(1,1',1"-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮，海因斯(Heinis)等人应用化学国际版(Angew Chem,Int Ed.2014;53:1602-1606)。

[0007] 已经开发了基于噬菌体展示的组合方法以针对感兴趣的靶标生成和筛选大的双环肽文库(海因斯等人(2009)，自然-化学生物学(Nat Chem Biol)5(7)，502-7和WO 2009/098450)。简而言之，含有三个半胱氨酸残基和两个有六个随机氨基酸的区域(Cys-$(Xaa)_6$-

Cys-(Xaa)$_6$-Cys)的线性肽组合文库在噬菌体上展示并通过将半胱氨酸侧链共价连接到小分子支架进行环化。

发明内容

[0008] 根据一个方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含BT5528或其药学上可接受的盐、组氨酸盐酸盐、蔗糖和聚山梨醇酯20。在一些实施例中，包含BT5528或其药学上可接受的盐、组氨酸盐酸盐、蔗糖和聚山梨醇酯20的药物组合物是冻干粉末。

[0009] 在另一方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含BT5528或其药学上可接受的盐、组氨酸盐酸盐、蔗糖、聚山梨醇酯20和右旋糖。在一些实施例中，包含BT5528或其药学上可接受的盐、组氨酸盐酸盐、蔗糖、聚山梨醇酯20和右旋糖的药物组合物是含药物调配物的水。

[0010] 在另一方面，本发明提供一种治疗患者中的与EphA2表达相关的晚期恶性肿瘤的方法，其包含向患者施用如本文所述的药物组合物。在一些实施例中，本发明提供一种治疗患者中的与EphA2表达相关的晚期恶性肿瘤的方法，其包含通过IV输注每周向患者施用在水中包含BT5528或其药学上可接受的盐、组氨酸、蔗糖、聚山梨醇酯20和右旋糖的药物调配物。

具体实施方式

[0011] 1.本发明的某些实施例的一般描述：

[0012] 已经为BT5528开发了稳定的冻干调配物，其可复原用于施用。在开发过程中，观察到BT5528吸附到小瓶表面，并且复原具有挑战性。在单独的冻干循环中研究了BT5528吸附到小瓶表面的原因。

[0013] 许多假设被提出作为潜在原因：最终产品中的高氯化钠浓度、复原产品的更碱性pH、硅烷化的小瓶和肽的过度干燥。这些假设中的每一个都与替代糖、表面活性剂和较低BT5528浓度的调配物筛选一起评估，以研究这是否改善了复原特征。在较低pH预冻干的情况下获得了复原时间的改善，但是油滴仍保留在小瓶的表面上。氯化钠含量的降低、硅烷化小瓶的使用和较低的二次干燥温度(以增加产品的最终水分含量)并未改善复原特征。替代糖或表面活性剂未产生改善。

[0014] 出人意料地，发现BT5528浓度从4mg/mL降低至2mg/mL改善了复原特征。复原时间减少，且复原后小瓶表面上没有观察到油滴。2mg/mL调配物相对于理论值的回收率处于目标值，相比之下，4mg/mL调配物始终低于目标值。

[0015] 因此，在一个方面，本发明提供一种包含BT5528或其药学上可接受的盐的固体药物组合物，其通过从液体调配物中去除溶剂来制备，例如通过冻干，其中BT5528或其药学上可接受的盐的浓度为约2-4mg/mL。

[0016] 在另一方面，本发明提供使用本文所述的药物组合物治疗与EphA2表达相关的晚期实体肿瘤恶性肿瘤的方法。

[0017] 2.化合物和定义：

[0018] 如本文所用，术语“BT5528”为具有如下文所示的结构的双环毒素结合物，其中分子骨架为1,1',1"-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)，且肽配体包含以

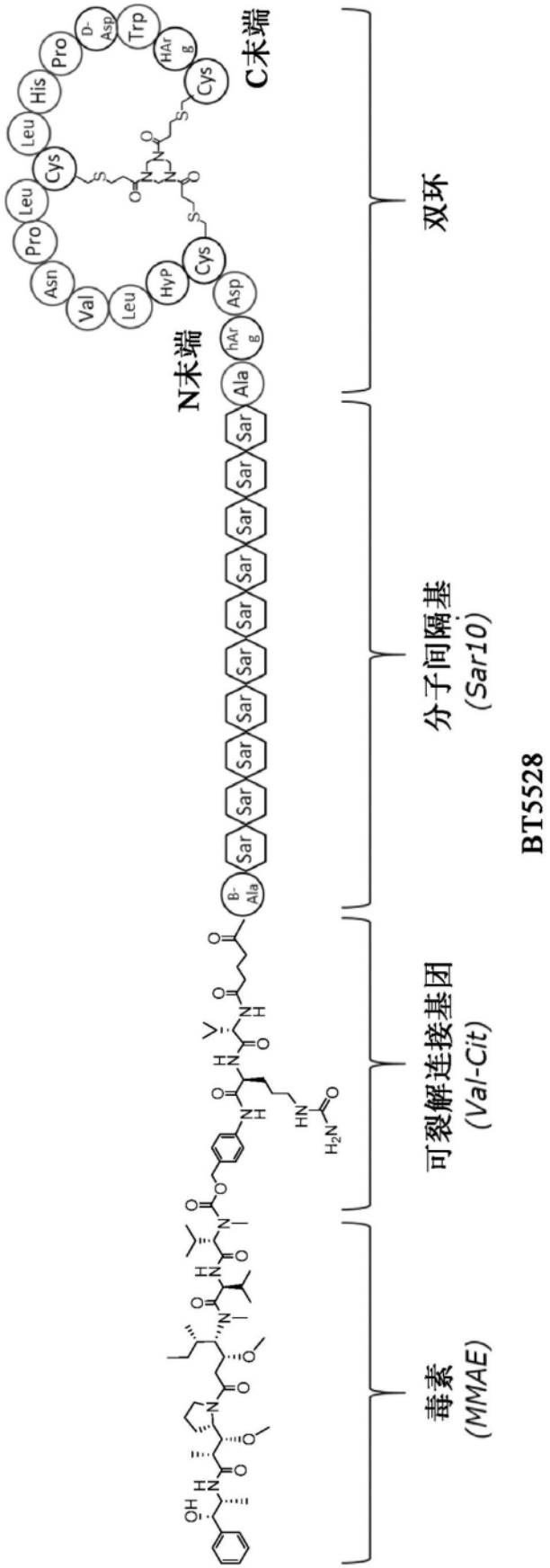
下氨基酸序列：

[0019] (β-Ala)-Sar_{10}-A(HArg)D-C_i(HyP)LVNPLC_{ii}LHP(D-Asp)W(HArg)C_{iii}(SEQ ID NO:1)

[0020] 其中Sar为肌氨酸，HArg为高精氨酸，且HyP为羟基脯氨酸。

[0021] 如本文所用，术语“药学上可接受的盐”是指在合理医学判断范围内适用于与人类和低等动物的组织接触而无不当毒性、刺激、过敏反应等，且与合理的效益/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐为所属领域中熟知的。举例来说，贝尔奇(Berge)等人在以引用的方式并入本文中的药物科学杂志(J.Pharmaceutical Sciences)，1977,66,1-19中详细描述了药学上可接受的盐。本发明化合物的药学上可接受的盐包含衍生自合适的无机和有机酸和碱的盐。药学上可接受的无毒酸加成盐的实例是氨基与无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和过氯酸)或有机酸(如乙酸、草酸、顺丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、丁二酸或丙二酸)形成的盐，或通过使用所属领域中所用的其它方法(如离子交换)形成的盐。其它药学上可接受的盐包括己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、甲酸盐、反丁烯二酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘化物、2-羟基-乙烷磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。

[0022]



[0023] 衍生自适当碱的盐包括碱金属盐、碱土金属盐、铵盐和$N^+(C_{1-4}烷基)_4$盐。代表性碱金属盐或碱土金属盐包括钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐等。适当时，其它药学上可接受的盐

包括使用如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸根以及芳基磺酸根等平衡离子形成的无毒铵、季铵以及胺阳离子。应了解，盐形式在本发明的范围内，并且提及的肽配体包括所述配体的盐形式。

[0024] 本发明的盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成，所述常规化学方法如以下文献中所描述的方法：药用盐：特性、选择和使用(Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use)，P.海因里希斯塔尔(P.Heinrich Stahl)(编者)，卡米尔G.韦穆特(Camille G.Wermuth)(编者)，ISBN:3-90639-026-8，精装，共388页，2002年8月。一般来说，此类盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与适当碱或酸在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中反应来制备。

[0025] 如本文所用，术语“约”应具有在给定值或范围的10％内的含义。在一些实施例中，术语“约”是指给定值的10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或1％内。

[0026] 除非另外陈述，否则本文中所描绘的结构还意味着包括所述结构的所有异构(例如，对映异构、非对映异构和几何异构(或构象异构))形式；举例来说，对每个不对称中心的R和S构型、Z和E双键异构体以及Z和E构象异构体。因此，本发明化合物的单一立体化学异构体以及对映异构、非对映异构和几何异构(或构象异构)混合物都在本发明的范围内。除非另有说明，否则本发明化合物的所有互变异构形式都在本发明的范围内。另外，除非另外陈述，否则本文中所描绘的结构还意味着包括不同之处仅在于存在一或多个同位素增浓原子的化合物。举例来说，具有包括由氘或氚置换氢或由^{13}C或^{14}C增浓的碳置换碳的本发明结构的化合物在本发明的范围内。这类化合物适用作例如分析工具，用作生物分析中的探针，或用作根据本发明的治疗剂。

[0027] 3.药物组合物

[0028] 根据一个方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含BT5528或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂或载剂。在一些实施例中，本发明的药物组合物包含约21.2mg BT5528或其药学上可接受的盐。

[0029] 在一些实施例中，本发明的药物组合物为固体药物组合物。在一些实施例中，本发明的固体药物组合物为粉末。在一些实施例中，本发明的药物组合物为冻干粉末。在一些实施例中，本发明的固体药物组合物为颗粒。

[0030] 在一些实施例中，本发明的药物组合物为液体药物组合物。在一些实施例中，本发明的液体药物组合物为可接受的媒剂或溶剂中的药物调配物。在一些实施例中，可接受的媒剂或溶剂选自无菌水、林格氏溶液、U.S.P.和等张氯化钠溶液。在一些实施例中，可接受的媒剂或溶剂为无菌水。在一些实施例中，可接受的媒剂或溶剂为无菌可注射介质。在一些实施例中，本发明的液体药物组合物包含约2-4mg/mL BT5528或其药学上可接受的盐。

[0031] 在一些实施例中，药学上可接受的赋形剂或载剂包含缓冲剂。在一些实施例中，缓冲剂选自磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质，如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。在一些实施例中，缓冲剂为组氨酸盐酸盐。在一些实施例中，缓冲剂为氢氧化钠。在一些实施例中，缓冲剂为盐酸。

[0032] 在一些实施例中，缓冲剂处于将本发明的药物组合物的pH调节至约6-8的量。在一

些实施例中，缓冲剂为组氨酸盐酸盐，其量为每mg BT5528或其药学上可接受的约1-3mg。在一些实施例中，组氨酸盐酸盐的量为每mg BT5528或其药学上可接受的约1.31或2.62mg。在一些实施例中，本发明的液体药物组合物包含浓度为约5.24mg/mL的组氨酸盐酸盐。

[0033] 在一些实施例中，本发明的液体药物组合物的pH为约6-8。在一些实施例中，本发明的液体药物组合物的pH为约6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8.0。在一些实施例中，本发明的液体药物组合物的pH为约6.5或7.0。

[0034] 在一些实施例中，药学上可接受的赋形剂或载剂包含惰性药学上可接受的赋形剂或载剂。在一些实施例中，惰性药学上可接受的赋形剂或载剂为柠檬酸钠或磷酸二钙。在一些实施例中，惰性药学上可接受的赋形剂或载剂为填充剂或增量剂。在一些实施例中，填充剂或增量剂为淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇或硅酸。在一些实施例中，惰性药学上可接受的赋形剂或载剂为粘合剂。在一些实施例中，粘合剂为羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖或阿拉伯胶。在一些实施例中，惰性药学上可接受的赋形剂或载剂选自蔗糖、海藻糖、右旋糖或其组合。在一些实施例中，惰性药学上可接受的赋形剂或载剂为蔗糖。

[0035] 在一些实施例中，惰性药学上可接受的赋形剂或载剂(例如蔗糖)的量为每mg BT5528或其药学上可接受的约10-35mg。在一些实施例中，惰性药学上可接受的赋形剂或载剂(例如蔗糖)的量为每mg BT5528或其药学上可接受的约15或30mg。在一些实施例中，液体药物组合物包含浓度为约60mg/mL的惰性药学上可接受的赋形剂或载剂(例如蔗糖)。

[0036] 在一些实施例中，药学上可接受的赋形剂或载剂包含表面活性剂。在一些实施例中，表面活性剂为聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯-20、聚山梨醇酯-40、聚山梨醇酯-60、聚山梨醇酯-65、聚山梨醇酯-80、聚山梨醇酯-85或其组合)。在一些实施例中，表面活性剂选自泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆188)；Triton™；十二烷基硫酸钠(SDS)；月桂基硫酸钠；辛基糖苷钠；月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油醇基-磺基甜菜碱、硬脂酰-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油醇基-肌氨酸、硬脂酰-肌氨酸、亚油醇基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺丙基-甜菜碱、椰油酰胺丙基-甜菜碱、亚油酰胺丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺丙基-甜菜碱、棕榈酰胺丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺丙基)、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-二甲胺；甲基椰油酰基牛磺酸钠或甲基油酰牛磺酸二钠；和Monaquat™系列(摩那工业公司(Mona Industries,Inc.)，新泽西州帕特森市(Paterson,N.J.))、聚乙二醇、聚丙二醇以及乙二醇和丙二醇的共聚物(例如普洛尼克(pluronics)，PF68)。在一些实施例中，表面活性剂为聚山梨醇酯20。

[0037] 在一些实施例中，表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的量为每mg BT5528或其药学上可接受的约0.01-0.15mg。在一些实施例中，表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的量为每mg BT5528或其药学上可接受的约0.025、0.05或0.1mg。在一些实施例中，液体药物组合物包含浓度为约0.1或0.2mg/mL的表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)。

[0038] 在一些实施例中，药学上可接受的赋形剂或载剂包含等张性调节剂。在一些实施例中，等张性调节剂为氯化钠、右旋糖、氯化钙或其组合。在一些实施例中，等张性调节剂为右旋糖。在一些实施例中，等张性调节剂为氯化钠。在一些实施例中，等张性调节剂为氯化

钠和右旋糖的组合。

[0039] 在一些实施例中,本发明提供一种药物组合物,所述药物组合物包含BT5528或其药学上可接受的盐、组氨酸盐酸盐、蔗糖和聚山梨醇酯20。在一些实施例中,本发明的药物组合物包含:

[0040] BT5528或其药学上可接受的盐;

[0041] 每mg BT5528或其药学上可接受的约1.31-2.62mg组氨酸盐酸盐;

[0042] 每mg BT5528或其药学上可接受的约15-30mg蔗糖;和

[0043] 每mg BT5528或其药学上可接受的约0.05-0.1mg聚山梨醇酯20。

[0044] 在一些实施例中,本发明提供一种固体药物组合物,所述药物组合物为冻干粉末,其包含:

[0045] 约21.2mg BT5528或其药学上可接受的盐;

[0046] 每mg BT5528或其药学上可接受的约55.5mg组氨酸盐酸盐;

[0047] 每mg BT5528或其药学上可接受的约636mg蔗糖;和

[0048] 每mg BT5528或其药学上可接受的约1.06-2.12mg聚山梨醇酯20。

[0049] 在一些实施例中,本发明提供一种固体药物组合物,所述药物组合物为冻干粉末,其包含:

[0050] 约21.2mg BT5528或其药学上可接受的盐;

[0051] 每mg BT5528或其药学上可接受的约27.8mg组氨酸盐酸盐;

[0052] 每mg BT5528或其药学上可接受的约318mg蔗糖;和

[0053] 每mg BT5528或其药学上可接受的约1.06mg聚山梨醇酯20。

[0054] 在一些实施例中,本发明提供一种液体药物组合物,其包含:

[0055] 约2-4mg/mL BT5528或其药学上可接受的盐;

[0056] 约5.25mg/mL组氨酸盐酸盐;

[0057] 约60mg/mL蔗糖;和

[0058] 约0.1-0.2mg/mL聚山梨醇酯20。

[0059] 在一些实施例中,本发明提供一种通过将本发明的固体药物组合物溶解于水中制备的液体药物组合物。在一些实施例中,本发明提供一种通过将本发明的固体药物组合物溶解于可注射介质(例如生理盐水或5%右旋糖)中制备的液体药物组合物。在一些实施例中,本发明提供一种液体药物组合物,其通过将本发明的固体药物组合物在水中复原,接着用5%右旋糖稀释来制备。在一些实施例中,将液体药物组合物稀释至5%右旋糖IV袋中以供IV施用。在一些实施例中,5%右旋糖IV袋中的液体药物组合物在IV施用之前在室温(约20-25℃)下储存至多约4小时。在一些实施例中,5%右旋糖IV袋中的液体药物组合物在IV施用之前在冷藏(约2-8℃)条件下储存至多约20小时。在一些实施例中,5%右旋糖IV袋中的液体药物组合物在IV施用之前在冷藏(约2-8℃)条件下储存至多约20小时,随后在室温(约20-25℃)下储存至多约4小时。

[0060] 在一些实施例中,本发明提供一种固体药物组合物,所述药物组合物包含BT5528或其药学上可接受的盐、组氨酸盐酸盐、蔗糖、聚山梨醇酯20和右旋糖。在一些实施例中,本发明提供一种液体药物组合物,所述药物组合物包含BT5528或其药学上可接受的盐、组氨酸盐酸盐、蔗糖、聚山梨醇酯20、右旋糖和水。在一些实施例中,药物组合物的组分的量、浓

度和比率如上文所述。

[0061] 4.药物组合物的用途

[0062] 在一个方面，本发明提供一种治疗患者中的与EphA2表达相关的晚期实体肿瘤恶性肿瘤的方法或用途，其包含向所述患者施用如本文所述的药物组合物。在一些实施例中，与EphA2表达相关的晚期实体肿瘤恶性肿瘤选自非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、三阴性乳腺癌(TNBC)、胃癌/上消化道(GI)癌、胰腺癌和尿道上皮癌。在一些实施例中，与EphA2表达相关的晚期实体肿瘤恶性肿瘤为NSCLC的腺癌亚型(腺-NSCLC)。

[0063] 在一些实施例中，本发明的方法包含向患者静脉内施用如本文所述的药物组合物。在一些实施例中，本发明的药物组合物通过IV注射施用。在一些实施例中，本发明的药物组合物通过IV输注施用。在一些实施例中，本发明的药物组合物的IV输注持续约5-30分钟。在一些实施例中，本发明的药物组合物的IV输注持续约30-90分钟。在一些实施例中，本发明的药物组合物的IV输注持续约30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85或90分钟。在一些实施例中，本发明的药物组合物的IV输注持续约60分钟。在一些实施例中，本发明的药物组合物的IV输注持续约2、2.5、3、3.5或4小时。

[0064] 在一些实施例中，本发明的药物组合物每1、2、3、4、5、6或7天向患者施用一次。在一些实施例中，本发明的药物组合物每周向患者施用。在一些实施例中，本发明的药物组合物每两周向患者施用一次。

[0065] 在一些实施例中，本发明的药物组合物以约1-27mg/m^2的剂量施用。在一些实施例中，本发明的药物组合物以约2-20mg/m^2的剂量施用。在一些实施例中，本发明的药物组合物以约2-20mg/m^2的剂量施用。在一些实施例中，本发明的药物组合物以约2.2、4.4、7.3、11、14.6或19.4mg/m^2的剂量施用。在一些实施例中，本发明的药物组合物以约1.5-3.5、3.5-5.5、6.5-8.5、10-12、13.5-15.5或18.5-20.5mg/m^2的剂量施用。在一些实施例中，本发明的药物组合物以约1-10或10-20mg/m^2的剂量施用。在一些实施例中，本发明的药物组合物以约21、22、23、24、25、26或27mg/m^2的剂量施用。

[0066] 在一些实施例中，本发明的药物组合物向至少18岁的患者施用。

[0067] 在一些实施例中，本发明的药物组合物向东部肿瘤协作组(ECOG)机能状态评分为0或1的患者施用。实例1中描述了0和1的ECOG机能状态评分。

[0068] 在一些实施例中，根据实体肿瘤(RECIST)v1.1中的反应评估标准，向患有可测量疾病的患者施用本发明的药物组合物。

[0069] 在一些实施例中，向具有可接受器官功能的患者施用本发明的药物组合物。在一些实施例中，具有可接受器官功能的患者具有选自以下的实验室数据：

[0070] 肾功能：通过科克罗夫特-高尔特方程(Cockcroft-Gault equation)或通过24小时尿液收集测量的肌酐清除率≥50mL/min；

[0071] 总胆红素≤1.5×ULN(正常值上限)；

[0072] 血清白蛋白≥2.5g/dL；

[0073] 在存在肝转移的情况下，天冬氨酸转氨酶(AST)≤2.5×ULN或≤5×ULN；

[0074] 在存在肝转移的情况下，丙氨酸转氨酶(ALT)≤2.5×ULN或≤5×ULN；以及

[0075] 国际标准化比率(INR)<1.3或≤机构ULN(不允许抗凝剂)。

[0076] 在一些实施例中，向具有可接受血液学功能的患者施用本发明的药物组合物。在

一些实施例中，具有可接受血液学功能的患者具有选自以下的实验室数据：

[0077] 血红蛋白≥9g/dL；

[0078] 绝对中性粒细胞计数(ANC)≥1500个细胞/mm^3；和

[0079] 血小板计数≥75,000个细胞/mm^3。

[0080] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物的4周内没有红细胞或血小板输注或生长因子。

[0081] 在一些实施例中，患者患有NSCLC的腺癌亚型(腺-NSCLC)，其已用尽所有标准治疗选择，包括在基于铂的化学疗法期间或之后的进展，和/或至少一种先前的治疗方案已失败，在最近的治疗方案上有放射线照相进展的证据。在一些实施例中，患者具有EGFR、ALK、NTRK、ROS1或其它基因组肿瘤畸变。在一些实施方案中，患者尚未接受针对驱动突变疾病的适当治疗。在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物之前至少28天没有接受过免疫疗法。

[0082] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物之前的14天内没有接受过化疗治疗。在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物之前的28天或5个半衰期(以较短者为准)内没有接受过抗癌治疗。在一些实施例中，患者具有已根据不良事件通用术语标准(CTCAE)v 5.0解决到1级的先前毒性(脱发除外，其必须不超过2级)。

[0083] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物的4周内没有接受过实验性治疗。

[0084] 在一些实施例中，患者目前没有使用CYP3A4的强抑制剂或诱导剂或P-gp的强抑制剂(包括基于草药或食物)进行治疗。

[0085] 在一些实施例中，患者对本发明的药物组合物的任何成分或对单甲基奥瑞他汀E(MMAE)没有任何敏感性。

[0086] 在一些实施例中，患者没有任何显著的医学病况、危及生命的疾病、活动性不受控制的感染或器官系统功能障碍(例如腹水、凝血病、脑病)。

[0087] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物的4周内没有进行任何大手术(不包括血管通路的放置)。

[0088] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物的30天内没有接受过活疫苗。

[0089] 在一些实施例中，患者没有不受控制的、有症状的脑转移瘤。在一些实施例中，患者在不使用类固醇的情况下或在小于或等于10mg每日泼尼松或等效物的稳定或减少剂量下进行局部疗法后至少4周内具有稳定的神经状态。

[0090] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物之前没有不受控制的高血压(收缩压[BP]≥139mmHg；舒张压≥89mmHg)。在一些实施例中，患者患有高血压，所述高血压在首剂本发明的药物组合物之前已经稳定控制至少3个月。

[0091] 在一些实施例中，在首剂本发明的药物组合物之前6个月内，患者没有记录的脑血管事件(中风或短暂性缺血发作)、不稳定性心绞痛、心肌梗塞、充血性心力衰竭或纽约心脏协会III-IV级症状的病史。

[0092] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物之前的6个月内不具有>470毫秒的平均静息校正QT间期(QTcF)。

[0093] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物之前的6个月内没有任何增加

QTc延长风险或心律失常事件风险的因素，例如心力衰竭、低钾血症、先天性长QT综合征、长QT综合征家族史或40岁以下不明原因猝死，或已知可延长QT间期的任何伴随药物。

[0094] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物之前的6个月内，在静息心电图(ECG)的节律、传导或形态方面没有任何临床上重要的异常，例如完全左束支传导阻滞、三度心脏传导阻滞。

[0095] 在一些实施例中，患者未患人类免疫缺陷病毒(HIV)或获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。

[0096] 在一些实施例中，患者不具有阳性乙型肝炎表面抗原和/或抗乙型肝炎核心抗体。

[0097] 在一些实施例中，患者具有阴性聚合酶链反应(PCR)分析并接受适当的抗病毒疗法。

[0098] 在一些实施例中，如果丙型肝炎病毒(HCV)抗体呈阳性，则患者具有病毒负荷呈阳性的活动性丙型肝炎感染。

[0099] 在一些实施例中，患者已接受丙型肝炎感染的治疗并且具有≥12周的持续病毒学反应。

[0100] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物之前的3个月内没有血栓栓塞事件和/或出血病症(例如，深静脉血栓形成[DVT]或肺栓塞[PE])。

[0101] 在一些实施例中，患者在首剂本发明的药物组合物之前的3年内未患另一种恶性肿瘤。在一些实施例中，患者没有来自先前诊断的恶性肿瘤的任何残留疾病(不包括意图治愈的充分治疗的基底细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、宫颈上皮内瘤形成/宫颈原位癌或原位黑色素瘤或乳腺管原位癌)。

[0102] 在一些实施方案中，患者在首剂本发明的药物组合物之前的最近14天内没有进行全身性抗感染治疗或发热。

[0103] 在一些实施例中，本发明提供本发明的药物组合物和纳武单抗的组合用途，用于治疗与EphA2表达相关的晚期实体肿瘤恶性肿瘤。纳武单抗可以按照标签上的描述进行施用，所述标签可以在https://www.opdivohcp.com/dosing/dosing-schedules找到，其内容以全文引用的方式并入本文中。在一些实施例中，每2周施用240mg纳武单抗。在一些实施例中，每4周施用480mg纳武单抗。在一些实施例中，纳武单抗以30分钟IV输注形式施用。

[0104] 在组合用途的一些实施例中，先前不知道患者对免疫检查点抑制剂不耐受。在组合用途的一些实施例中，不知道患者对检查点抑制剂疗法具有高敏性。在组合用途的一些实施例中，患者先前未进行器官移植。在组合用途的一些实施例中，患者先前未被诊断出患有临床相关免疫缺陷。在组合用途的一些实施例中，患者没有需要治疗的活跃的全身感染。在组合用途的一些实施例中，患者每天服用不超过10mg泼尼松等效物或其它强免疫抑制剂。在组合用途的一些实施例中，患者没有除脱发或白癜风以外的自身免疫疾病病史。在组合用途的一些实施例中，患者没有间质性肺病病史。

[0105] 范例

[0106] 以下实例意图说明本发明，且不应被解释为对其的限制。除非另有说明，否则所有氨基酸均以L-构型使用。

[0107] 实例1.制备BT5528冻干药品

[0108] 首先进行方法评估，然后对候选调配物进行热评估。进行伴有相关稳定性的测试

冻干,然后进行冻干循环优化、额外的调配物筛选和过滤评估。

[0109] 1.BT5528方法评估和冷冻/解冻稳定性

[0110] 记录本体溶液外观、pH、密度和BT5528分析/相关物质。使额外样品经受三个冷冻(-20℃)/解冻循环,在每个循环后评估外观、pH、UPLC和亚可见微粒(MFI)。

[0111] 1.1.溶液制备

[0112] 将14g WFI(70%w/v)称重至小玻璃烧杯中,向其中称出104mg组氨酸HCl,并在冲洗下加入,接着搅拌直至溶解。一旦溶解,称出1.2g蔗糖,加入,接着磁力搅拌直至溶解。测量溶液的pH并将其调节至目标值(pH 7.7-8.1)。初始pH为3.42pH并使用0.1M NaOH溶液调节至8.07pH。

[0113] 通过将0.5g聚山梨醇酯20溶解于50mL WFI中制备1%(w/v)聚山梨醇酯20溶液。在搅拌下将400μL 1%(w/v)聚山梨醇酯20溶液添加到组氨酸/蔗糖溶液中。称出86.8mg BT5528且在连续搅拌下缓慢添加到溶液中。API完全溶解大约需要90分钟。

[0114] 测量溶液的pH并将其调节至目标值(pH 6.8-7.2)。添加API后pH为7.79,并使用0.1M HCl溶液调节至7.19pH。将溶液转移至20mL容量瓶中并用WFI定容至最终体积。通过单个0.22μm PES膜针筒过滤器过滤溶液。最终溶液是透明、无色的溶液,不含任何可见的微粒。测得最终溶液的密度为1.025g/cm^3。过滤前和过滤后的样品被传递给分析人员进行HPLC分析。将剩余的本体溶液以2mL体积填充至2mL玻璃小瓶中,并进行三个冷冻/解冻循环。

[0115] 1.2.结果

[0116] 1.2.1.外观和pH

[0117] 在三个冷冻/解冻循环的过程中,外观或pH没有显著变化。

[0118] 表1-1.溶液外观和pH

[0119]

时间点/储存	外观	pH
过滤前	不含可见微粒的透明、无色溶液	7.2
过滤后	不含可见微粒的透明、无色溶液	N/A
冷冻解冻循环1	不含可见微粒的透明、无色溶液	7.3
冷冻解冻循环2	不含可见微粒的透明、无色溶液	7.3
冷冻解冻循环3	不含可见微粒的透明、无色溶液	7.3

[0120] 1.2.2.分析和相关物质

[0121] 结果显示在过滤前和过滤后期间,分析或相关物质没有变化。在冷冻/解冻评估期间,分析或相关物质也没有变化。

[0122] 表1-2.分析

[0123]

时间点/储存	小瓶 1 含量 (mg/mL)	小瓶 2 含量 (mg/mL)	平均含量 (mg/mL)	回收/理论 [1] (%)	回收/过滤前 [2] (%)
过滤前	3.8259	3.8287	3.83	95.68	-
过滤后	3.8249	3.8305	3.83	95.69	100.01
冷冻解冻循环 1	3.8189	3.8102	3.81	95.36	99.67
冷冻解冻循环 2	3.8021	3.8316	3.82	95.42	99.73
冷冻解冻循环 3	3.8297	3.8241	3.83	95.67	99.99

[0124] [1]作为理论4mg/mL的百分比。

[0125] [2]作为过滤前结果的百分比。

[0126] 表1-3.相关物质

[0127]

RRT	样品和量(面积%)				
	过滤前	过滤后	冷冻解冻循环1	冷冻解冻循环2	冷冻解冻循环3
0.97	0.12	0.13	0.11	0.11	0.11
0.99	2.20	2.18	2.18	2.19	2.16
1.03	0.98	0.97	0.97	0.94	1.00
1.05	0.21	0.22	0.17	0.16	0.20
1.12	0.10	<LOQ	<LOQ	0.10	<LOQ
1.15	0.12	0.12	0.14	0.13	0.13
总计[1]	**3.73**	**3.62**	**3.57**	**3.63**	**3.60**

[0128] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0129] 1.3.论述和结论

[0130] 在过滤期间没有分析损失,表明API没有吸附到PES膜上。在小瓶经受三个冷冻/解冻循环后,分析和相关物质数据没有改变,证明API在冷冻/解冻循环期间是稳定的。

[0131] 2.阶段3-热评估

[0132] BT5528调配物的热特性通过冷冻干燥显微法(FDM)和差示扫描量热法(DSC)评估,以鉴定会影响冻干循环设计的任何塌陷温度或热事件。

[0133] 调配物细节展示于表1-4中。通过评估活性调配物和安慰剂调配物的热特征,可以确定冷冻干燥循环的参数。

[0134] 表1-4.调配物组成

[0135]

组分	浓度(mg/mL)
BT5528	4.0
组氨酸HCl	5.24
蔗糖	60.0
聚山梨醇酯20	0.2
氢氧化钠	足量至目标pH
WFI	足量至1mL

[0136] 2.1.冷冻干燥显微法(FDM)

[0137] FDM用于确定调配物的塌陷温度。分析了几个样品以改进FDM循环设定点参数。每次分析均使用具有亮场透射光的10×物镜进行。来自进行的每次分析的关键观察结果展示于表1-5中。

[0138] 表1-5.根据FDM的热观察结果

[0139]

运行	冷冻(°C)	塌陷的起始(°C)	塌陷(°C)
1	-29.5	-32.7	-30.2
2	-28.2	-32.5	-29.3
3	-28.2	-31.7	-30.2

[0140]

4	-28.2	-31.9	-30.4

[0141] 样品结构的细微变化,例如不明确的干燥前沿被认为是样品塌陷的第一个迹象,其次是亮点的出现。这些视觉观察结果被解释为塌陷的起始。随着样品中出现扩展的更大明亮区域,结构的进一步损失很明显。这些区域随后形成裂口,导致严重塌陷。这种相互连

接的明亮区域/裂口的发展被视为产品的塌陷。

[0142] 2.2.差示扫描量热法(DSC)

[0143] 除了FDM之外，调配物还通过DSC使用表1-6中显示的参数进行分析。关键观察结果的概述展示于表1-7中。

[0144] 表1-6.不退火的DSC设定点参数

[0145]

参数	设定
循环	25℃至-50℃，以1℃/min，在-50℃保持10分钟，-50℃至25℃，以1℃/min
坩埚	密封100μL铝
参考样品	空坩埚
吹扫气体	60mL/min N_2
干燥气体	170mL/min N_2

[0146] 表1-7.来自DSC热分析图的关键观察结果

[0147]

观察结果	温度(℃)	
冷冻起始	-9.69	-18.74
玻璃化转变/共晶熔体	未检测到	未检测到
熔融起始	-13.21	-10.72

[0148] DSC展示大的、明确定义的冷冻放热和熔融吸热。未观察到其它显著的热事件。

[0149] 2.2.1.论述和结论

[0150] FDM和DSC产生的数据用于帮助冻干循环的设计。这些温度指示了一次干燥过程中的冷冻温度和最高允许产品温度。调配物的塌陷温度约为-30℃，此温度将决定冻干循环的一次干燥温度。

[0151] 基于热评估的结果，冻干循环旨在将产品温度保持在低于一次干燥期间的塌陷温度5-10℃，在此情况下约为-30℃。

[0152] 3.阶段5-测试冻干

[0153] BT5528调配物的热特征在阶段4-热评估中确定。第4阶段产生的热数据显示塌陷温度约为-30℃。

[0154] 基于此数据，表1-8中详述的测试冻干循环被设计为将产品温度保持在低于塌缩温度5-10℃。制备了足够的小瓶以支持如表1-9中详述的冻干产品的稳定性研究和复原稳定性评估。将4mg/mL的溶液以1mL的体积填充至2mL透明I型玻璃小瓶中。冻干产品将用1mL WFI复原，以达到4mg/mL的目标浓度。紧邻活性小瓶的区域用含有1mL缓冲溶液的小瓶填充，以更接近地模拟满室的条件。

[0155] 3.1.溶液制备

[0156] 将约80mL WFI(约70％w/v最终体积)添加到玻璃烧杯中，向其中添加628.8mg组氨酸HCl并磁力搅拌直至溶解。一旦溶解，称出7.2g蔗糖并将其添加到WFI/组氨酸溶液中，接着搅拌直至溶解。测量溶液的pH并用0.1M氢氧化钠调节至目标值(pH 7.7-8.1)。初始pH为3.93pH并调节至pH 7.74。

[0157] 通过将0.5g聚山梨醇酯20溶解于50mL WFI中制备1％(w/v)聚山梨醇酯20溶液。在搅拌下将2.4mL 1％(w/v)聚山梨醇酯20溶液添加至组氨酸/蔗糖溶液中。称出615mg BT5528且在连续搅拌下缓慢添加至溶液中。BT5528完全溶解大约需要120分钟。搅拌90分钟

后,API似乎已粘附至烧杯的底部和侧面。额外的30分钟搅拌时间产生不含可见微粒的无色溶液。

[0158] 测量溶液的pH并用0.1M盐酸调节至目标值(pH 6.8-7.2)。添加API后pH为7.83,并使用0.1M HCl溶液调节至7.10pH。将溶液转移至100mL和20mL容量瓶中,均未装满,并用WFI定容至最终体积,接着返回至原始烧杯并搅拌混合。

[0159] 过滤前收集溶液样品,并通过单个0.22μm PES针筒过滤器过滤剩余物,过滤后收集样品用于分析。滤液为澄清、无色的,没有可见微粒。

[0160] 3.2.冻干

[0161] 将溶液以1mL的体积填充到2mL小瓶中,并使用13mm冷冻干燥塞子部分塞住。探测位于中心和前面的单个小瓶以监测整个循环中的产品温度。小瓶周围的区域用含有1mL安慰剂溶液的2mL小瓶装满。使用表表1-8中的循环冻干小瓶。

[0162] 基于搁架和产品温度(热电偶探针)以及通过皮拉尼规(Pirani gauge)和电容压力计测量的腔室压力监测循环的进程。

[0163] 表1-8.冻干循环

[0164]

步骤	循环阶段	温度(℃)	压力(毫托)	时间(min)	升温速率(℃/min)
1	装载	5	N/A	N/A	N/A
2	保持	5	N/A	30	N/A
3	升温	-40	N/A	180	0.25
4	冷冻	-40	N/A	180	N/A
5	额外冷冻	-40	100	30	N/A
6	升温	-25	100	75	0.20
7	一次干燥	-25	100	3701	N/A

[0165]

8	升温	25	20	250	0.20
9	二次干燥	25	20	866	N/A
10	完成		用(纯)氮气将小瓶加塞至 722,000 毫托		
总循环持续时间约 89 小时(约 3.7 天)					

[0166] 冻干塞是白色的,结构良好,没有塌陷的迹象。观察到的填充高度收缩,但没有迹象表明这会影响冻干塞的结构。

[0167] 将冻干产品置于稳定状态并在25℃/60%RH的加速储存条件下测试1个月(根据表1-9)。通过外观、水分含量以及根据UPLC的分析和相关物质来评估冻干产品。基于复原时间、溶液外观、pH和亚可见微粒(仅T=0)评估复原产品。

[0168] 表1-9.干燥产品评估

[0169]

测试	T=0 (周)	T = 1 (周)	T = 2 (周)	T=4 (周)
UPLC 冻干前	√	n.a.	n.a.	n.a.
卡尔费歇尔滴定(Karl Fischer titration)	√	-	√	√
UPLC	√	√	√	√
复原时间[1]	√	-	√	√
复原的 pH[1]	√	-	√	√
亚可见微粒	√	-	-	-

[0170] [1]用1mL WFI复原

[0171] 3.3.结果

[0172] 3.3.1.冻干物的外观

[0173] 稳定性研究期间冻干物的外观记录在表1-10中。

[0174] 表1-10.冻干物的外观,001/BCL/18

[0175]

时间点/储存		外观
初始(T = 0)		有轻微收缩迹象的白色冻干滤饼
25℃/60%RH	T=1 wk	-
	T=2 wk	有收缩迹象的白色冻干滤饼
	T=4 wk	有收缩迹象的白色冻干滤饼

[0176] 表1-11.外观、复原时间和pH,001/BCL/18

[0177]

时间点/储存		复原时间(秒)	外观	pH
初始(T = 0)		108[1]	不含可见微粒的透明、无色溶液。	7.1
25℃/60%RH	T = 1 wk	-	-	-
	T = 2 wk	529[2]	不含可见微粒的透明、无色溶液。	7.1
	T = 4 wk	386 409	透明、无色溶液，小瓶底部有斑点。	7.1

[0178] [1]复原时,小瓶底部明显出现厚厚的白色泡沫。这应该在未来的时间点进行监测。

[0179] [2]复原时,将小瓶旋转几分钟,然后在剩余时间内保持于实验台上。在小瓶底部发现小油点,未发现白色固体。

[0180] [3]复原时,将小瓶旋转几分钟,然后在剩余时间内保持于实验台上。仍然注意到潜在产品的斑点粘附到小瓶底部,接着使用另一个小瓶进行侦察实验。将此小瓶放置30分钟,但仍存在斑点。在复原分析期间,在每个旋转和沉降阶段都拍摄了照片,但是由于填充体积小,因此难以显示斑点的存在。

[0181] 3.3.3.水分含量

[0182] 表1-12.水分含量,001/BCL/18

[0183]

时间点/储存		水分(%)
初始(T = 0)		1.94[1]
25℃/60%RH	T = 1 wk	-
	T = 2 wk	1.44
	T = 4 wk	2.11[1]

[0184] [1]在T＝0和T＝4周时间点发现水分含量有很大变化。客户在T＝0时就此事联系过。变化可能是由于冻干机内小瓶位置的差异和手动填充体积的差异。

[0185] 3.3.4.亚可见微粒

[0186] 表1-13.亚可见微粒,001/BCL/18

[0187]

时间点/储存		计数/小瓶 [1]		合格/不合格 [2]
		≥10 μm	≥25 μm	
初始(T = 0)		45	1	合格
25℃/60%RH	T = 1 wk	-	-	-
	T = 2 wk	-	-	-
	T = 4 wk	-	-	-

[0188] [1]其中提升体积为1mL

[0189] [2]每小瓶直径≥10μm的颗粒数量<6000＝合格,且每小瓶直径≥25μm的颗粒数量<600＝合格

[0190] 3.3.5.冻干前分析

[0191] 表1-14.过滤前和过滤后本体溶液分析,001/BCL/18

[0192]

时间点/储存	含量(mg/mL)	回收/理论[1](%)	回收/过滤前[2](%)
过滤前	3.79	94.8	-
过滤后	3.65	91.3	96.3

[0193] [1]作为理论4mg/mL的百分比。

[0194] [2]作为过滤前结果的百分比。

[0195] 3.3.6.冻干前相关物质

[0196] 表1-15.冻干前和冻干后相关物质

[0197]

RRT	样品和量(面积%)	
	过滤前	过滤后
0.96	0.36	0.26
0.96	1.65	1.61
1.07	0.58	0.51
1.08	0.38	0.36
1.20	0.11	0.14
1.27	0.16	0.11
1.29	0.13	0.11
总计[1]	3.37	3.10

[0198] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0199] 3.3.7.分析(小瓶含量)

[0200] 表1-16.分析,001/BCL/18

[0201]

时间点/储存		小瓶 1 (毫克/小瓶)	小瓶 2 (毫克/小瓶)	平均含量(毫克/小瓶)	回收/理论[1] (%)	回收/T = 0[2] (%)
初始(T = 0)		3.7302	3.7607	3.75	93.6	-
25℃/60%RH	T = 1 wk	3.7816	3.7132	3.75	93.7	99.9
	T = 2 wk	3.8873	3.7879	3.84	95.9	102.3
	T = 4 wk	3.8077	3.8044	3.81	95.2	101.5

[0202] [1]作为理论5毫克/小瓶的百分比。

[0203] [2]作为初始(T=0)结果的百分比。

[0204] 3.3.8.相关物质

[0205] 表1-17.纯度/相关物质(面积%),25℃/60%RH

[0206]

RRT	时间点和量(面积%)			
	初始(T = 0)	1 wk	2 wk	4 wk
0.96	0.31	0.10	<LOQ	0.28
0.98	1.65	1.30	1.46	1.59
1.07	0.58	0.69	ND	0.49
1.08	0.39	0.53	0.66	0.75
1.14	ND	ND	0.14	ND
1.27	0.14	ND	ND	0.13
1.28	0.12	0.21	0.21	0.16
1.43	ND	ND	ND	0.11
总计[1]	3.19	2.83	2.47	3.51

[0207] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0208] 3.3.9.论述和结论

[0209] 发现用于测试冻干的循环参数适用于先导调配物;冻干塞是白色的,有轻微的收缩。在25℃/60%RH下保持稳定4周的冻干塞的外观没有变化。在整个研究过程中,复原溶液的pH保持在7.1,但是,复原时间存在变化,并且注意到小瓶表面上的油滴。在冻干循环优化期间将进一步检查复原程序和复原产品的外观。

[0210] 分析值在4周稳定性研究中保持一致,但应注意浓度为理论值的93-95%。由于过滤前的结果也很低,这表明在混配过程中API吸附到玻璃器皿上,而不是过滤损失。

[0211] 相关物质数据在T=0和T=4周时相当,分别为3.19%和3.51%,然而,相关物质数据存在一定程度的变化性,从2.47到3.51%。

[0212] 已显示先导调配物在25℃/60%RH下储存时是稳定的,且因此进展到冻干循环优化。

[0213] 4.阶段6-冻干循环优化

[0214] 由测试冻干循环产生的冻干产品的稳定性数据展示所述产品在25℃/60%RH下储存期间是稳定的。第一优化循环运行使用-20℃的一次干燥搁架温度,目的是减少一次干燥的持续时间。

[0215] 填充少量小瓶(18个),以提供足够数量的小瓶用于冻干产品的测试和复原稳定性评估。

[0216] 将4mg/mL的溶液以5.3mL的体积填充至10mL透明I型玻璃小瓶中。冻干产品用5.3mL WFI复原,以达到4mg/mL的目标浓度。

[0217] 为了评估疏水性涂层的使用是否防止产品吸附到小瓶表面,如在测试冻干稳定性期间观察到的,还使用了2mL TopLyo™小瓶。少量小瓶(5个)被填充0.5mL体积并在同一循环中冻干。

[0218] 4.1.冻干优化循环1

[0219] 4.1.1.溶液制备

[0220] 如下制备150mL本体溶液:

[0221] 将大约100mL WFI添加到包含磁性搅拌棒的200mL烧杯中,在冲洗下向其中添加786.3mg组氨酸HCl,并搅拌直至溶解,这需要5分钟。

[0222] 一旦溶解,称出9.0004g蔗糖并在冲洗下加入烧杯中,接着磁力搅拌直至溶解。搅拌溶液5分钟直至蔗糖完全溶解。

[0223] 测量溶液的pH并用1M氢氧化钠将其调节至pH 7.7-8.1的目标pH,随后添加3mL1%(w/v)聚山梨醇酯20。将溶液搅拌5分钟直至均质。

[0224] 称出651mg BT5528并在冲洗下缓慢添加到混配容器中。将溶液磁力搅拌90分钟,少量API似乎已吸附到烧杯表面上。应注意,API似乎在溶解过程中最初在完全溶解之前结块。

[0225] 测量溶液的pH并用0.1M HCl调节至pH 7.03(目标pH为pH 6.8-7.2)。接着将溶液转移到100mL和50mL容量瓶中,均未装满,并用WFI定容。将溶液放回初始烧杯中并搅拌混合。

[0226] 溶液通过单个0.22μm PES针筒过滤器过滤,并收集过滤前和过滤后的样品用于分析。所得滤液是不含可见微粒的透明、无色溶液。

[0227] 4.1.2.冻干

[0228] 将溶液以5.3mL的体积填充到10mL I型透明玻璃小瓶中，并以0.5mL的体积填充到标准和TopLyo™(硅烷化小瓶)中，以确定疏水性表面的使用是否会减少吸附到表面上的BT5528。

[0229] 探测位于托盘中心的单个小瓶以监测整个循环中的产品温度。根据温度(搁架/产品探针)和腔室压力(电容压力计/皮拉尼规)监测循环的进程，以确定一次和二次干燥的终点。

[0230] 使用表1-18中的循环直接从搁架上冻干小瓶。

[0231] 表1-18.冻干循环

[0232]

步骤	循环阶段	温度(°C)	压力(毫托)	时间(min)	升温速率(°C/min)
1	装载	5	N/A	N/A	N/A
2	保持	5	N/A	30	N/A
3	升温	-40	N/A	180	0.25
4	冷冻	-40	N/A	180	N/A
5	额外冷冻	-40	100	30	N/A
6	升温	-20	100	100	0.20
7	一次干燥	-20	100	4658	N/A
8	升温	25	20	225	0.20
9	二次干燥	25	20	368	N/A
10	完成		用(纯)氮气将小瓶加塞至 722,000 毫托		
总循环持续时间约 96.2 小时(约 4 天)					

[0233] 冻干塞是白色的，结构良好，并且有轻微的收缩。收缩似乎是调配物的固有特征，因为这也在初始干燥温度为-25℃的测试冻干循环中观察到。TopLyo™小瓶中的冻干塞展示严重塌陷，且因此无法测试所述产品。与2mL小瓶中的0.5mL填充相比，10mL小瓶中可能由于5.3mL填充体积的干燥时间延长而导致塌陷，导致产品温度增加到高于塌陷温度。

[0234] 4.1.3.结果

[0235] 批次细节展示于表1-19中。批次002/BCL/18在优化循环1中冻干。

[0236] 表1-19.药品组成(批号和调配物细节)

[0237]

002/BCL/18	4 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸 HCl、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20 (5.3 mL 填充-21.2 毫克/小瓶)

[0238] 4.1.3.1.溶液的外观、pH和复原时间

[0239] 表1-20.溶液的外观、pH、复原时间

[0240]

样品	外观	pH	复原时间(分钟)
002/BCL/18	不含可见颗粒的透明无色溶液	7.1	12.03[1]

[0241] [1]为了复原，需要剧烈摇动。在记录的时间之后，没有大块残留，但仍然可以看到油性物质沉积物，表明产品粘附到小瓶上，图1，需要涡旋混合以获得完全溶解。

[0242] 表1-21.外观冻干塞

[0243]

样品	外观
002/BCL/18	具有明显收缩的均质白色冻干滤饼

[0244] 4.1.3.2.亚可见微粒

[0245] 表1-22.亚可见微粒

[0246]

样品	10μm(计数/小瓶)[1]	25μm(计数/小瓶)[1]	合格/不合格[2]
002/BCL/18	173	4	合格

[0247] [1]填充时;体积为5.3ml。

[0248] [2]每小瓶直径≥10μm的颗粒数量≤6000＝合格,且每小瓶直径≥25μm的颗粒数量≤600＝合格

[0249] 4.1.3.3.水分含量

[0250] 表1-23.含水量

[0251]

样品	平均水(%w/w)
002/BCL/18	2.50

[0252] 4.1.3.4.分析(小瓶含量)

[0253] 表1-24.分析

[0254]

样品		过滤前分析(mg/mL)	过滤后分析(mg/mL)	回收后/理论[1](%)	分析(mg/mL)	回收/理论[1](%)	回收/过滤后[2](%)
002/BCL/18	小瓶 1	4.2092	4.0521	96.27	4.2369	105.92	104.56
	小瓶 2				4.1854	104.63	103.29

[0255] [1]作为理论4mg/mL的百分比

[0256] [2]作为过滤后结果的百分比。

[0257] 4.1.3.5.纯度/相关物质

[0258] 表1-25.纯度/相关物质

[0259]

RRT	量(面积/面积%)		
	过滤前	过滤后	002/BCL/18
0.97	0.92	0.90	0.86
0.98	1.78	1.40	1.75
BT5528	96.07	96.40	96.17
1.09	0.76	0.85	0.78
1.16	0.13	0.14	0.11
127	0.11	0.10	0.12
1.30	0.16	0,15	0.15
总计[1]	3.86	3.54	3.77

[0260] 相关物质的总和≥0.10%

[0261] 4.1.4.论述和结论

[0262] 冻干塞的外观展示-20℃的一次干燥温度适合于先导调配物并且在一次干燥的初始阶段将产品温度保持在低于塌陷温度。随着干燥接近完成,温度在一次干燥结束时超过塌陷温度。将建议在第二优化循环中将一次干燥温度进一步提高到-15℃,因为没有产品塌陷的迹象。

[0263] 冻干产品的复原与具有复原所需的油滴形成和涡旋混合的测试冻干产品类似。由于调配物中存在聚山梨醇酯20,因此涡旋的使用导致产品过度发泡。复原时间约为12分钟,高于10分钟的目标时间。

[0264] 分析值处于目标值,表明在混配期间或过滤期间没有由于吸附到玻璃器皿而导致的API损失。纯度/相关物质数据在冻干后与过滤前和过滤后类似。

[0265] 4.2.冻干优化循环2

[0266] 第一优化循环运行使用-20℃的一次干燥搁架温度，其减少一次干燥的持续时间。冻干产品是白色的，结构良好，没有塌陷的迹象。因此，建议在第二冻干循环中将搁架温度提高到-15℃，以进一步减少一次干燥的持续时间。

[0267] 填充了少量小瓶(18个)，以提供足够数量的小瓶用于冻干产品的测试。

[0268] 将4mg/mL的溶液以5.3mL的体积填充至10mL透明I型玻璃小瓶中。冻干产品用5.3mL WFI复原，以达到4mg/mL的目标浓度。

[0269] 为了评估疏水性涂层的使用是否防止产品吸附到小瓶表面，如在测试冻干稳定性期间观察到的，使用了2mL TopLyo™小瓶。少量小瓶(5个)用0.5mL体积溶液填充并在同一循环中冻干。还填充了少量没有涂层的2mL小瓶作为与TopLyo™小瓶的比较，因为在循环优化1期间观察到塌陷，且因此不可能评估硅烷化涂层的影响。

[0270] 4.2.1.溶液制备

[0271] 如下制备120mL本体溶液。

[0272] 将大约80mL WFI添加到包含磁性搅拌棒的200mL烧杯中，在冲洗下向其中添加628.8mg组氨酸HCl，并搅拌直至溶解，这需要5分钟。

[0273] 一旦溶解，称出7.2g蔗糖并在冲洗下加入烧杯中，接着磁力搅拌直至溶解。搅拌溶液5分钟直至蔗糖完全溶解。

[0274] 测量溶液的pH并用1M氢氧化钠将其调节至pH 7.7-8.1的目标pH，随后添加2.4mL1％(w/v)聚山梨醇酯20。将溶液搅拌5分钟直至均质。

[0275] 称出615mg BT5528并在冲洗下缓慢添加到混配容器中。将溶液磁力搅拌120分钟，90分钟后API似乎已经吸附到烧杯底部的表面以及磁性搅拌棒上。额外的搅拌时间产生不含微粒的无色溶液。

[0276] 测量溶液的pH并调节至pH 7.1(目标pH为pH 6.8-7.2)。接着将溶液转移到100mL和20mL容量瓶中，均未装满，并用WFI定容。将溶液放回初始烧杯中并搅拌混合。

[0277] 溶液通过单个0.22μm PES针筒过滤器过滤，并收集过滤前和过滤后的样品用于分析。所得滤液是不含可见微粒的透明、无色溶液。

[0278] 4.2.2.冻干

[0279] 探测位于托盘中心的单个小瓶以监测整个循环中的产品温度。根据温度(搁架/产品探针)和压力(电容压力计/皮拉尼规)差异监测循环的进程，以确定一次和二次干燥的终点。

[0280] 使用表1-26中的循环直接从搁架上冻干小瓶。由于产品探针故障，在冻干循环期间未获得温度数据。皮拉尼规和电容压力计的收敛用于指示一次和二次干燥的完成。

[0281] 表1-26.冻干循环

[0282]

步骤	循环阶段	温度(℃)	压力(毫托)	时间(min)	升温速率(℃/min)
1	装载	5	N/A	N/A	N/A
2	保持	5	N/A	30	N/A
3	升温	-40	N/A	180	0.25
4	冷冻	-40	N/A	180	N/A
5	额外冷冻[1]	-40	100	30	N/A
6	升温	-15	100	125	0.20
7	一次干燥	-15	100	300	N/A
8	升温	25	20	250	0.20
9	二次干燥	25	20	866	N/A
10	完成		用(纯)氮气将小瓶加塞至 722,000 毫托		
总循环持续时间约 89 小时(约 3.7 天)					

[0283] 4.2.3.结果

[0284] 批次细节展示于表1-28中。

[0285] 表1-27.药品组成(批号和调配物细节)

[0286]

003/BCL/18	4 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸 HCl、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20 (5.3 mL 填充-21.2 毫克/小瓶)

[0287] 4.2.3.1.溶液的外观、pH和复原时间

[0288] 表1-28.溶液的外观、pH、复原时间

[0289]

样品	外观	pH	复原时间(分钟)
003/BCL/18	不含可见颗粒的透明无色溶液	6.7	11.14

[0290] [1]为了复原,需要剧烈摇动。在记录的时间之后,没有大块残留,但仍然可以看到油性物质沉积物,表明产品粘附到小瓶上,需要涡旋混合以获得完全溶解。

[0291] 表1-29.外观冻干塞

[0292]

样品	外观
003/BCL/18	具有明显收缩的均质白色冻干滤饼

[0293] 4.2.3.2.亚可见微粒

[0294] 表1-30.亚可见微粒

[0295]

样品	10μm(计数/小瓶)[1]	25μm(计数/小瓶)[1]	合格/不合格[2]
003/BCL/18	209	4	合格

[0296] [1]填充时,体积为5.3mL[2]每小瓶直径≥10μm的颗粒数量≤6000＝合格,且每小瓶直径≥25μm的颗粒数量≤600＝合格

[0297] 4.2.3.3.水分含量

[0298] 表1-31.含水量

[0299]

样品	平均水(%w/w)
003/BCL/18	2.13

[0300] 4.2.3.4.分析(小瓶含量)

[0301] 表1-32.分析

[0302]

样品		过滤前分析(mg/mL)	过滤后分析(mg/mL)	回收后/理论[1](%)	分析(mg/mL)	回收/理论[1](%)	回收/过滤后[2](%)
003/BCL/18	小瓶1	3.9008	3.9849	98.57	102.16	21.4138	4.0403
	小瓶2					22.6418	4.2720

[0303] [1]作为理论4mg/mL的百分比

[0304] [2]作为过滤后结果的百分比。

[0305] 4.2.3.5.纯度/相关物质

[0306] 表1-33.纯度/相关物质批次003/BCL/18

[0307]

RRT	量(面积/面积%)		
	过滤前	过滤后	003/BCL/18
0.96	0.19	0.19	0.18
BT5528	98.89	98.85	98.83
1.12	0.72	0.81	0.77
总计[1]	0.91	1.00	1.05

[0308] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0309] 3.2.4.论述和结论

[0310] 冻干塞的外观展示-15℃的一次干燥温度适合于先导调配物并且在一次干燥的初始阶段将产品温度保持在低于塌陷温度。随着干燥接近完成,温度在一次干燥结束时超过塌陷温度。

[0311] 冻干产品的复原与具有复原所需的油滴形成和涡旋混合的测试冻干产品类似。由于调配物中存在聚山梨醇酯20,因此涡旋的使用导致产品过度发泡。复原时间约为11分钟,高于10分钟的目标时间。

[0312] TopLyo™小瓶中冻干塞的复原比标准I型透明玻璃2mL小瓶更长,并且观察到API对表面的更大吸附。这表明使用硅烷化小瓶不会改善冻干产品的复原或分析回收率值。

[0313] 分析值处于目标值,表明在混配期间或过滤期间没有由于吸附到玻璃器皿而导致的API损失。纯度/相关物质数据在冻干后与过滤前和过滤后类似,但应注意,总相关物质明显少于优化循环1。

[0314] 当与冻干优化循环1(2.50%(w/w))相比时,此循环的水分含量值类似,为2.13%(w/w)。

[0315] 使用酸性溶液对10mL小瓶(21.2毫克/小瓶BT5528)中的冻干产品的复原进行评估。由于BT5528是一种碱性蛋白质,因此调节pH可能会改善复原。假设用稀酸而不是WFI进行复原以实现较低的缓冲液pH,从而提高复原后的溶解速率。用酸性溶液改善重构将表明冻干前调配物的目标pH变为较低值(例如,相比于当前pH 7.1的pH 6或6.5)将改善单独使用WFI的冻干产品的复原。

[0316] 用5.3mL 0.01M HCl或0.02M HCl复原单个小瓶的冻干BT5528产品,并在15分钟的时间内记录外观。使用0.02M HCl溶液改善了复原产品的重构时间和外观(就油滴形成而言)。这表明冻干产品中更酸性的pH可能会改善复原特征。

[0317] 遇到的复原挑战的第二假设是由于混配过程所致的调配物中的高盐浓度。在API溶解之前,使用氢氧化钠将pH从约pH 3.5调节至pH 7.7-8.1,随后使用盐酸将pH调节至目标pH 6.8-7.2。

[0318] 5.组氨酸/pH评估

[0319] 使用酸性溶液进行复原改善了复原时间和外观。为了研究冻干前的较低pH是否改善了复原时间和分析结果，制备了pH 6、pH 6.5和pH 7.0的三种溶液，使用表36中的循环冻干，接着在冻干后进行评估。

[0320] 此外，对混配过程进行了修改，以减少使用氢氧化钠进行pH调节和最终产品中的氯化钠含量。未调节在添加BT5528之前制备的溶液的pH，且仅在API溶解之后才调节。

[0321] 调配物展示于表1-34中。

[0322] 表1-34.组氨酸/pH调配物组成(批号和调配物细节)

[0323]

调配物 1	4 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸 HCl、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20，pH 6
调配物 2	2 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸 HCl、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20，pH 6.5
调配物 3	2 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸、60 mg/mL 蔗糖、0.1 mg/mL 聚山梨醇酯 20，pH 7

[0324] 5.1.溶液制备

[0325] 制备的三种调配物中的每一种的溶液制备细节如下。

[0326] 调配物1-组氨酸HCl-pH 6

[0327] 将大约35mL WFI添加到含有磁性搅拌棒的烧杯中。在冲洗下向其中添加262.1mg组氨酸HCl，并磁力搅拌直至溶解。一旦溶解，称出3.0322g蔗糖并在冲洗下加入，接着搅拌直至溶解。将1mL的1％(w/v)聚山梨醇酯20溶液移液到组氨酸/蔗糖溶液中并搅拌直至实现完全溶解。测得溶液的pH为pH 4.01。

[0328] 称出258mg BT5528并缓慢加入，接着搅拌90分钟直至完全溶解。测量溶液的pH并用1M氢氧化钠调节至pH 6.02，接着转移到50mL容量瓶中并用WFI定容。将溶液放回初始烧杯中并搅拌混合。

[0329] 溶液通过单个0.22μm PES针筒过滤器过滤，滤液是不含可见微粒的透明、无色溶液。

[0330] 调配物2-组氨酸HCl-pH 6.5

[0331] 将大约35mL WFI添加到含有磁性搅拌棒的烧杯中。在冲洗下向其中添加262.2mg组氨酸HCl，并磁力搅拌直至溶解。一旦溶解，称出3.0360g蔗糖并在冲洗下加入，接着搅拌直到溶解。将1mL的1％(w/v)聚山梨醇酯20溶液移液到组氨酸/蔗糖溶液中并搅拌直至实现完全溶解。测得溶液的pH为pH 4.01。

[0332] 称出257mg BT5528并缓慢加入，接着搅拌90分钟直至完全溶解。测量溶液的pH并用1M氢氧化钠调节至pH 6.49，接着转移到50mL容量瓶中并用WFI定容。将溶液放回初始烧杯中并搅拌混合。溶液通过单个0.22μm PES针筒过滤器过滤，滤液是不含可见微粒的透明、无色溶液。

[0333] 调配物3-组氨酸-pH 7

[0334] 将大约35mL WFI添加到含有磁性搅拌棒的烧杯中。在冲洗下向其中添加262.0mg组氨酸，并磁力搅拌直至溶解。一旦溶解，称出3.0439g蔗糖并在冲洗下加入，接着搅拌直到溶解。将1mL的1％(w/v)聚山梨醇酯20溶液移液到组氨酸/蔗糖溶液中并搅拌直至实现完全溶解。测得溶液的pH为pH 7.73。

[0335] 称出257mg BT5528并缓慢加入，接着搅拌90分钟直至完全溶解。测量溶液的pH并

用1M盐酸调节至pH 6.97,接着转移到50mL容量瓶中并用WFI定容。将溶液放回初始烧杯中并搅拌混合。

[0336] 溶液通过单个0.22μm PES针筒过滤器过滤,滤液是不含可见微粒的透明、无色溶液。

[0337] 5.2.冻干

[0338] 将制备的三种调配物中的每一种以5.3mL的体积填充到10mL I型透明玻璃小瓶中。

[0339] 将小瓶装载至冷冻干燥托盘的中心并使用表1-35中的循环直接从搁架上冻干。根据温度(搁架/产品探针)和压力(电容压力计/皮拉尼规)差异监测循环的进程,以确定一次和二次干燥的终点。

[0340] 表1-35.冻干循环

[0341]

步骤	循环阶段	温度(℃)	压力(毫托)	时间(min)	升温速率(℃/min)
1	装载	5	N/A	N/A	N/A
2	保持	5	N/A	30	N/A
3	升温	-40	N/A	180	0.25
4	冷冻	-40	N/A	180	N/A
5	额外冷冻[1]	-40	190	30	N/A
6	升温	-15	100	125	0.29
7	一次干燥	-15	190	3739	N/A
8	升温	25	20	200	0.20
9	二次干燥	25	20	904	N/A
10	完成		用(纯)氮气将小瓶加塞至 722,000 毫托		
总循环持续时间约 90 小时(约 3.7 天)					

[0342] 5.3.结果

[0343] 5.3.1.溶液的外观、pH和复原时间

[0344] 为了复原,需要剧烈摇动。在记录的时间之后,没有留下大块,但是仍然可以看到材料粘在小瓶壁上,表明产品粘附到小瓶上。需要涡旋混合以获得完全溶解。

[0345] 表1-36.溶液的外观、pH、复原时间

[0346]

样品	外观	pH	复原时间(分钟)
组氨酸HCl pH 6.0	不含可见颗粒的透明无色溶液	6.0	3分钟04秒
组氨酸HCl pH 6.5	不含可见颗粒的透明无色溶液	6.5	6分钟04秒
组氨酸pH 7.0	不含可见颗粒的透明无色溶液	7.0	8分钟38秒

[0347] 表1-37.冻干塞的外观

[0348]

样品	外观
组氨酸HCl pH 6.0	有明显收缩的白色冻干滤饼
组氨酸HCl pH 6.5	有明显收缩的白色冻干滤饼
组氨酸pH 7.0	有明显收缩的白色冻干滤饼

[0349] 5.3.2.分析(小瓶含量)

[0350] 表1-38.分析

[0351]

样品		过滤前分析(mg/mL)	过滤后分析(mg/mL)	回收后/理论[1](%)	回收后/过滤前(%)	分析(毫克/小瓶)	回收/理论[1](%)	回收/过滤后[2](%)
pH 6.0	小瓶 1	4.3353	4.3047	107.62	99.29	3.8921	97.30	90.42
	小瓶 2					3.9510	98.78	91.78
pH 6.5	小瓶 1	4.2583	4.2805	107.01	100.52	3.8813	97.03	90.67
	小瓶 2					3.9095	97.74	91.33
pH 7.0	小瓶 1	4.0259	4.0095	100.24	99.59	3.5649	89.12	88.91
	小瓶 2					3.6056	90.14	89.92

[0352] [1]作为理论4mg/mL的百分比

[0353] [2]作为过滤后结果的百分比。

[0354] 5.3.3.纯度/相关物质

[0355] 表1-39.纯度/相关物质组氨酸HCl pH 6.0

[0356]

RRT	量(面积/面积%)		
	过滤前	过滤后	组氨酸 HCl pH 6.0
0.96	0.29	0.25	0.33
BT5528	98.50	98.57	98.47
1.12	0.75	0.80	0.69
1.16	0.12	<LOQ	0.12

[0357]

1.33	0.11	0.13	0.10
总计[1]	1.27	1.18	1.24

[0358] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0359] 表1-40.纯度/相关物质。组氨酸HCl pH 6.5

[0360]

RRT	量(面积/面积%)		
	过滤前	过滤后	组氨酸 HCl pH 6.5
0.96	0.22	0.17	0.28
ST5528	99.66	98.80	98.24
1.10	ND	0.44	0.48
1.12	0.76	0.44	0.58
1.29	0.10	<LOQ	0.12
1.33	<LOQ	<LOQ	0.10
总计[1]	1.08	1.05	1.56

[0361] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0362] 表1-41.纯度/相关物质。组氨酸HCl pH 7.0

[0363]

RRT	量(面积/面积%)		
	过滤前	过滤后	组氨酸 HCl pH 7.0
0.94	<LOQ	ND	0.11
0.96	0.30	0.29	0.34
BT5528	98.37	98.41	98.62
1.10	0.45	0.52	ND
1.12	0.65	0.36	0.69
1.33	<LOQ	0.15	0.12
总计[1]	1.40	1.52	1.26

[0364] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0365] 5.3.4.论述和结论

[0366] 三种调配物的冻干塞的外观类似，表明pH或混配对产品外观没有影响。冻干塞的

外观与测试冻干和优化循环1和2相同。

[0367] 塞的复原时间随着pH增加，从pH 6的3分钟4秒增加到pH 7.0的8分钟38秒。这表明复原溶液的pH对复原时间有影响。另外，修改后的混配过程(减少氢氧化钠的使用)似乎改善了复原时间，与先前的>11分钟相比，三种调配物的时间为<9分钟。然而，仍然需要涡旋混合来实现复原，并且在小瓶表面上可以看到油滴。因此，pH和盐的存在并不是API吸附到小瓶表面所涉及的唯一因素。

[0368] 三种调配物的纯度/相关物质类似(表1-39至表1-41)。分析数据显示在过滤期间没有BT5528的吸附损失(表1-38)。与pH 7相比，在pH 6下观察到较高分析(小瓶含量)，表明较低的冻干前pH提高了BT5528回收率。

[0369] 尽管与pH 7相比，在pH 6下的复原时间更短且回收率提高，但油滴仍然可见，且因此，进行了进一步的工作，评估替代糖和较低的二次干燥温度以增加最终产品的水分含量。据报道，BT5528在水中具有良好的溶解度，且据推测，较长复原时间和油滴形成可能是由于在冻干过程中肽的过度干燥所致。这可能导致水合壳的损失并改变了冻干产品中的肽构象。

[0370] 6.糖调配物筛选

[0371] 冻干前调配物的pH变化不会阻止在复原期间在小瓶表面上形成油性液滴，但确实改善了复原时间(pH 6短于pH 7)。

[0372] 由于在优化循环3期间冻干的调配物的吸附性质，将评估5种具有一系列糖和替代表面活性剂的调配物。调配物的组成展示于表1-42中。

[0373] 如第5.3.4节中所述，假设产品可能已经过度干燥，导致肽水合壳的去除，因此，除了糖/表面活性剂筛选以外，还研究了较低(0℃)的二次干燥时间。

[0374] 表1-42.药品组成(批号和调配物细节)

[0375]

调配物 1	4 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸 HCl、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20 (5.3 mL 填充-21.2 毫克/小瓶) 20 mL 小瓶
调配物 2	4 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸 HCl、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 80 (5.3 mL 填充-21.2 毫克/小瓶) 10 mL 小瓶
调配物 3	4 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸 HCl、60 mg/mL 海藻糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20 (5.3 mL 填充-21.2 毫克/小瓶) 10 mL 小瓶
调配物 4	4 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸 HCl、60 mg/mL 右旋糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20 (5.3 mL 填充-21.2 毫克/小瓶) 10 mL 小瓶
调配物 5	2 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL 组氨酸 HCl、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20 (10.6 mL 填充-21.2 毫克/小瓶) 20 mL 小瓶

[0376] 6.1.溶液制备

[0377] 除了单独详述的调配物5之外，每种调配物都以相同的方式制备。将大约35mL WFI添加到含有磁性搅拌棒的烧杯中。在冲洗下向其中添加约262mg组氨酸，并磁力搅拌直至溶解。一旦溶解，称出约3g蔗糖/海藻糖/右旋糖(分别为调配物1-2、3和4)并在冲洗下加入，接着搅拌直至溶解。将1mL 1％(w/v)聚山梨醇酯20溶液移液到调配物1、3和4的组氨酸/蔗糖溶液中，并且将1mL 1％(w/v)聚山梨醇酯80溶液移液到调配物2的组氨酸/蔗糖溶液中。搅拌溶液直至实现完全溶解。测量每种溶液的pH。

[0378] 调配物5如下制备：将约70mL WFI添加到含有磁性搅拌棒的烧杯中。在冲洗下向其中添加约524.9mg组氨酸，并磁力搅拌直至溶解。一旦溶解，称出6.0031g蔗糖并在冲洗下加

入，接着搅拌直到溶解。将2mL的1％(w/v)聚山梨醇酯20溶液移液到组氨酸/蔗糖溶液中并搅拌直至实现完全溶解。测量溶液的pH。

[0379] 向五种调配物中的每一种中称出约257mg的BT5528并缓慢加入，接着搅拌90分钟直至完全溶解。应注意，在添加/溶解过程中，BT5528粘附到烧杯的侧面，且外观呈凝胶状。使用移液管将BT5528从烧杯的侧面移出，导致API完全溶解在溶液中。测量溶液的pH并用1M氢氧化钠将pH调节至6.5，接着转移至50mL(调配物1-4)或100mL(调配物5)容量瓶中并用WFI定容。将溶液放回初始烧杯中并搅拌混合。

[0380] 每种溶液通过单个0.22μm PES针筒过滤器过滤，滤液是不含可见微粒的透明、无色溶液。

[0381] 表1-43.溶液pH(批号、缓冲液pH和最终pH)

[0382]

调配物1	7.74	6.51
调配物2	7.75	6.52
调配物3	7.65	6.52
调配物4	7.76	6.51
调配物5	7.75	6.52

[0383] 6.2.冻干

[0384] 填充的溶液体积和小瓶类型展示于表1-44中。

[0385] 表1-44.小瓶类型和填充体积(批号、小瓶(mL)和填充体积(mL))

[0386]

调配物1	20	5.3
调配物2	10	5.3
调配物3	10	5.3
调配物4	10	5.3
调配物5	20	10.6

[0387] 表1-45.冻干循环参数

[0388]

步骤	循环阶段	温度(℃)	压力(毫托)	时间(min)	升温速率(℃/min)
1	装载	5	N/A	N/A	N/A
2	保持	5	N/A	30	N/A
3	升温	-40	N/A	180	0.25
4	冷冻	-40	N/A	180	WA
5	额外冷冻	-40	100	30	N/A
6	升温	-25	100	75	0.20
7	一次干燥	-25	100	6450	N/A
8	升温	0	20	125	0.20
9	二次干燥	0	20	1009	N/A
10	完成		用(纯)氮气将小瓶加塞至 722,000 毫托		
总循环持续时间约 135 小时 (约 5.6 天)					

[0389] 来自调配物1的冻干塞是白色的，结构良好且均质，没有收缩或塌陷的迹象。调配物2、4和5的冻干塞是白色、均质的，但有收缩的迹象。

[0390] 调配物3(海藻糖)展示塞的严重塌陷和回熔。

[0391] 海藻糖和右旋糖调配物的热特征在溶液被冻干之前没有确定，然而，使用了保守

的循环参数。文献中报道的海藻糖的塌陷温度约为-28℃，其高于蔗糖(-31℃)和右旋糖(-41℃)所报道的塌陷温度，且因此-25℃的一次干燥搁架温度预计是合适的。产品探测数据展示，在一次干燥的初始阶段，产品的温度约为-38℃，且因此预计不会塌陷。

[0392] 含有右旋糖的调配物4没有塌陷，且因此不可能确定观察到的塌陷的原因。

[0393] 6.3.结果

[0394] 6.3.1.溶液的外观、pH和复原时间

[0395] 表1-46.溶液的外观、pH、复原时间

[0396]

样品	外观[1]	pH	复原时间(分钟)
调配物1 4mg/mL	透明无色溶液，在侧壁上注意到吸附。	6.4	1分钟35秒
调配物1 2mg/mL	透明无色溶液，在侧壁上注意到吸附。	6.5	3分钟17秒
调配物1 1.3mg/mL	透明无色溶液，在侧壁上注意到吸附。	6.5	7分钟27秒
调配物2	透明无色溶液，在侧壁上注意到吸附。	6.5	5分钟40秒
调配物3	透明无色溶液，滤饼不溶解	6.5	16分钟00秒
调配物4	透明无色溶液，在侧壁上注意到吸附。	6.5	6分钟40秒
调配物5	透明无色溶液，侧壁上的吸附较少[2]	6.5	4分钟03秒

[0397] 在优化循环分析期间，注意到所有调配物均存在吸附。调配物1至4具有显著吸附特性，药品在复原溶液上方和复原溶液内吸附至玻璃小瓶。调配物5(2mg/mL BT5528)产生最好的结果，药品仅在溶液稍上方吸附，且在溶液内没有注意到吸附。复原时间的变化源于在调配物1的整个测试过程中偏离的分析程序。这是由于调配物1的严重吸附性质而发生的。对于4mg/mL溶液，在添加复原介质后立即发生搅拌，从而在溶液上方产生严重的吸附扩散。在搅拌之前对2mg/mL进行沉降期，从而产生更好的复原性能，尽管仍然注意到吸附。对于1.3mg/mL溶液，进行5分钟的沉降期以最大限度地减少所需的搅拌。吸附没有随着这个膨胀的沉降期而改善。对于调配物2，向前进行2分钟沉降期、1分钟搅拌和最终1分钟沉降期，然后进行搅拌直至溶解。调配物5在调配物中表现最好，并且对于循环4优化，将对此调配物执行典型的复原方法(添加复原介质后立即搅拌)。

[0398] 表1-47.外观冻干塞

[0399]

样品	外观[1]
调配物1	均质的白色冻干滤饼
调配物2	具有明显收缩的均质白色冻干滤饼
调配物3	小瓶中心处的一个白色圆盘，有明显严重塌陷
配制物4	具有明显收缩的均质白色冻干滤饼
配制物5	具有明显收缩的均质白色冻干滤饼

[0400] [1]参看冻干滤饼照片的附录

[0401] 6.3.2.亚可见微粒

[0402] 表1-48.亚可见微粒

[0403]

样品	10μm(计数/小瓶)	25μm(计数/小瓶)	合格/不合格
调配物1[1]	855	71	合格
调配物2[1]	3127	473	合格
调配物3[1]	1866	46	合格

调配物4[1]	5752	1304	不合格
调配物5[2]	3074	21	合格

[0404] [1]填充时，体积为5.3mL[2]填充时，体积为10.6mL

[0405] 请注意，小瓶未经过高压灭菌/去热源，这可能会导致微粒物质读数被夸大。

[0406] 对于所有调配物，10μm的结果都被夸大，且调配物2和4是由于在复原时发生的吸附。这与冻干优化小瓶没有经历与技术批次小瓶相同的清洁程序一起产生了夸大的结果。除了调配物4在25μm水平上不合格外，所有结果均符合药典规格(每个容器<6000个颗粒、10μm和每个容器<600个颗粒)。这将归因于观察到的复原性能和吸附性质较差。

[0407] 6.3.3.含水量

[0408] 表1-49.含水量

[0409]

样品	平均水(%w/w)
调配物1	2.60
调配物2	2.87
调配物3	11.08
调配物4	1.64
调配物5	3.84

[0410] 除了被夸大的调配物3以外，所有调配物均产生<5％的最佳水含量。由于在无水甲醇中的溶解性差，调配物3需要剧烈混合和超声处理。此批次的溶解性差以及需要增加的混合和超声处理表明此调配物在水分含量方面表现不佳，并且与其它调配物相比，在夸大的不符合趋势结果中突出显示。

[0411] 6.3.4.分析和纯度结果

[0412] 6.3.4.1.过滤前和过滤后

[0413] 使用0.22μm PES膜针筒过滤器过滤样品。在通过VWD检测进行分析之前的过滤过程中未观察到任何问题。

[0414] 表1-50.过滤前和过滤后

[0415]

样品	过滤前[BT5528] (mg/mL)	过滤后 [BT5528] (mg/mL)	%回收率[1]
调配物 1	3.92	3.94	100.5
调配物 2	3.71	3.76	101.5
调配物 3	3.70	3.54	95.8
调配物 4	3.66	3.82	104.4
调配物 5	1.96	2.02	103.5

[0416] [1]相对于过滤前结果的％回收率。

[0417] 表1-51.过滤前的纯度/相关物质

[0418]

RRT	调配物和量(面积%)				
	1	2	3	4	5
BT5528	98.41	99.01	99.25	99.25	99.20
1.10	1.51	0.98	0.26	0.75	0.72
1.11	N.D	N.D	0.49	N.D	N.D
总计[1]	**1.5**	**1.0**	**0.8**	**0.8**	**0.7**

[0419] [1]相关物质的总和≥0.10％

[0420] 表1-52.过滤后的纯度/相关物质

[0421]

RRT	调配物和量(面积%)				
	1	2	3	4	5
BT5528	99.24	99.38	99.11	99.13	**99.30**
1.10	0.76	0.52	0.89	0.87	0.63
总计[1]	**0.8**	**0.5**	**0.9**	**0.9**	**0.6**

[0422] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0423] 调配物3的回收率较低且不符合趋势,从水分和复原细节中重新高光显示此调配物与其它调配物相比表现不佳。海藻糖仅存在于此调配物中,说明这种糖是低回收率和不符合趋势数据的根本原因。

[0424] 6.3.4.2.小瓶含量

[0425] 表1-53.冻干小瓶含量

[0426]

样品	小瓶 1 [BT5528] (毫克/小瓶)	小瓶 2 (BT5528] (毫克/小瓶)	平均值[BT5528] (毫克/小瓶)	%回收率[1]
调配物 1	21.30	21.38	21.34	100.7

[0427]

调配物 2	20.16	20.19	20.17	95.1
调配物 3	19.71	19.68	19.70	92.9
调配物 4	20.31	20.34	20.33	95.9
调配物 5	21.07	21.39	21.23	100.1

[0428] [1]相对于理论21.2毫克/小瓶BT5528的%回收率。

[0429] 平均相关物质报道于表1-54中。

[0430] 表1-54.纯度/相关物质

[0431]

RRT	调配物和量(面积%)				
	1	2	3	4	5
BT5528	99.30	99.13	99.24	99.30	99.22
1.10	0.70	0.87	0.76	0.70	0.79
总计[1]	**0.7**	**0.9**	**0.8**	**0.7**	**0.8**

[0432] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0433] 6.3.4.3.纯度/相关物质

[0434] 用3个单独体积的WFI(5.3mL、10.6mL和15.9mL)复原调配物1,分别得到4mg/mL、2mg/mL和1.3mg/mL的浓度。调配物2、3和4在5.3mL WFI中复原,得到4mg/mL的浓度,且调配物5在10.6mL WFI中复原,得到2mg/mL的浓度。评估分析和纯度并与理论值进行比较。

[0435] 表1-55.复原的小瓶含量

[0436]

样品	分析(mg/mL)	回收/理论[1](%)
调配物1(5.3mL侦查)	3.52	88.1
调配物1(10.6mL侦查)	1.02	50.9
调配物1(15.9mL侦查)	1.32	99.2
调配物2	3.55	88.8
调配物3	2.51	62.8
调配物4	3.42	85.5
调配物5	2.06	103.0

[0437] [1]相对于理论4mg/mL、2mg/mL和1.33mg/mL BT5528的%回收率。

[0438] 表1-56.调配物1的纯度/相关物质-三个侦察体积

[0439]

RRT	复原体积和量(面积%)		
	5.3 mL	10.6 mL	15.9 mL
0.98	0.52	<LOQ	<LOQ
BT5528	99.08	98.69	98.95
1.10	0.32	0.54	0.25
1.11	0.44	0.21	0.26
1.12	<LOQ	0.53	0.58
总计[1]	**0.9**	**1.3**	**1.1**

[0440] 表1-57.调配物2-5的纯度/相关物质

[0441]

RRT	调配物和量(面积%)			
	2	3	4	5
0.98	N.D	<LOQ	<LOQ	0.24
BT5528	98.74	98.80	98.38	98.69
1.10	0.46	0.50	0.52	0.26
1.11	0.58	0.59	0.66	0.33
1.12	0.41	<LOQ	0.41	0.53
总计[1]	**1.5**	**1.1**	**1.6**	**1.4**

[0442] 调配物1至5获得的分析值是可变的,这可以从初始复原数据中预期,得出BT5528对玻璃小瓶具有吸附特性的结论。调配物1(1.3mg/mL)和调配物5分别产生了最佳的%回收率(99.2%和103.0%)。其它%回收率可归因于复原过程中药品(API)的损失。颗粒吸附到玻璃小瓶上且不能完全溶解,进一步混合且静置约1小时的时段。1小时的静置时段是不切实际的程序,且对于循环优化4,静置时段将缩短到更小的时间范围(约5分钟)以帮助复原。

[0443] 6.4.论述和结论

[0444] 所有调配物均显示具有吸附性质,且因此在优化循环3的整个分析测试中都可以看到产品的变化性和损失。调配物5的表现优于其余四种评估的调配物。与其它调配物(4mg/mL)相比,调配物5的API浓度(2mg/mL)较低。建议在优化循环4中评估较低浓度的API。这将使复原性能得到进一步评估,并实现向技术批次推进的一致过程。在制造技术批次之前,百分比分析回收率始终处于目标值也很重要。

[0445] 7.冻干循环4

[0446] 由于调配物的吸附性质,在冻干过程中评估了另外的调配物。根据糖调配物筛选期间获得的数据,调配物1和5用另外的调配物重新评估,表1-58。在糖调配物筛选期间评估了较低(0℃)的二次干燥温度,以研究肽的过度干燥和水合壳损失的可能性。冻干优化循环4恢复到先前使用的25℃的二次干燥温度,因为0℃没有改善复原特征。

[0447] 来自糖调配物筛选的数据在2mg/mL的较低BT5528浓度下产生了改善的复原概况。由于此呈现的吸附减少,调配物5在优化循环4中保持不变,调配物6中引入了较低浓度的聚山梨醇酯20,以保持聚山梨醇酯与BT5528 API的比率与原始先导调配物(调配物1)一致。调配物的组成展示于表1-58中。

[0448] 表1-58.药品组成(批号和调配物细节)

[0449]

调配物 1	4 mg/mL BT5528、5.25 mg/mL 组氨酸、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20 (5.3 mL 填充-21.2 毫克/小瓶) 20 mL 小瓶
调配物 5	2 mg/mL BT5528、5.25 mg/mL 组氨酸、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 20 (10.6 mL 填充-21.2 毫克/小瓶) 20 mL 小瓶
调配物 6	2 mg/mL BT3528、5.24 mg/mL 组氨酸、60 mg/mL 蔗糖、0.1 mg/mL 聚山梨醇酯 20 (10.6 mL 填充-21.2 毫克/小瓶) 20 mL 小瓶

[0450] 7.1.溶液制备

[0451] 以相同方式制备每一调配物。将大约35mL或70mL WFI添加到含有磁性搅拌棒的烧杯中。在冲洗下向其中添加261.9mg组氨酸至调配物1(50mL)、524.9mg至调配物5以及524.7mg至调配物6(100mL),并磁力搅拌直至溶解。一旦溶解,添加3.0011g蔗糖至调配物1、6.0010g至调配物5以及6.0064g至调配物6,接着搅拌直至溶解。将1mL 1%(w/v)聚山梨醇酯20溶液移液到调配物1和调配物6的组氨酸/蔗糖溶液中,并将2mL移液到调配物5的所述溶液中。搅拌溶液直至实现完全溶解。测量每种溶液的pH。

[0452] 向三种调配物中的每一种中称出约257mg的BT5528并缓慢加入,接着搅拌90分钟直至完全溶解。应注意,在添加/溶解过程中,API粘附至调配物1的烧杯侧面,这对于调配物5和6来说不太明显(4mg/mL相比于2mg/mL)。使用移液管将API从烧杯的侧面移出,导致API完全溶解在溶液中。测量溶液的pH并用1M氢氧化钠将pH调节至6.5,接着转移至50mL(调配物1)或100mL(调配物5和6)容量瓶中并用WFI定容。将溶液放回初始烧杯中并搅拌混合。

[0453] 每种溶液通过单个0.22μm PES针筒过滤器过滤,滤液是不含可见微粒的透明、无色溶液。

[0454] 7.2.冻干

[0455] 将制备的溶液以5.3mL(调配物1)或10.6mL(调配物5和调配物6)的体积填充到20mL I型透明玻璃小瓶中,用20mm冷冻干燥塞子部分塞住并直接从使用表1-59中的循环的搁架上冻干。

[0456] 探测位于托盘中心的每一调配物的单个小瓶以监测整个循环中的产品温度。根据温度(产品探针/搁架)和压力(电容压力计/皮拉尼规)差异监测循环,以确定一次和二次干燥的终点。

[0457] 表1-59.冻干优化循环4

[0458]

步骤	循环阶段	温度 (℃)	压力(毫托)	时间(min)	升温速率 (℃/min)
1	装载	5	N/A	N/A	N/A
2	保持	5	N/A	30	N/A
3	升温	-40	N/A	180	0.25
4	冷冻	-40	N/A	180	N/A
5	额外冷冻	-40	100	30	N/A
6	升温	-25	100	75	0.20
7	一次干燥	-25	100	6386	N/A
8	升温	25	20	250	0.20
9	二次干燥	25	20	1102	N/A
10	完成		用(纯)氮气将小瓶加塞至 722,000 毫托		
总循环持续时间约 137 小时(约 5.7 天)					

[0459] 7.3.结果

[0460] 7.3.1.溶液的外观、pH和复原时间

[0461] 表1-60.溶液的外观、pH、复原时间

[0462]

样品	外观[1]	pH	复原时间(分钟)
调配物1	透明无色溶液，在侧壁上注意到中等吸附。	6.6	1分钟52秒
调配物5	透明无色溶液，侧壁上的吸附较少[2]	6.6	39秒
调配物6	透明无色溶液，侧壁上的吸附较少[2]	6.6	40秒

[0463] [1]所有调配物均具有可见颗粒。对于复原溶液的照片，参见图32。

[0464] 如前所述，更难以完全复原具有4mg/mL BT5528的调配物1。由于较低BT5528浓度，调配物5和6更易于复原。调配物1比调配物5和6产生更高程度的吸附，突出显示降低的2mg/mL BT5528浓度产生更好的复原，且随后发生更少的吸附，仅吸附非常小的颗粒。

[0465] 表1-61.外观冻干塞

[0466]

样品	外观
调配物1	具有明显收缩的均质白色冻干滤饼
配制物5	具有明显收缩的均质白色冻干滤饼
调配物6	具有明显收缩的均质白色冻干滤饼

[0467] 7.3.2.亚可见微粒

[0468] 表1-62.亚可见微粒

[0469]

样品	10μm(计数/小瓶)	25μm(计数/小瓶)	合格/不合格[3]
调配物[1]	191	18	合格
调配物5[2]	445	92	合格
调配物6[2]	247	35	合格

[0470] [1]填充时，体积为5.3mL

[0471] [2]填充时，体积为10.6mL

[0472] [3]每小瓶直径≥10μm的颗粒数量≤6000＝合格，且每小瓶直径≥25μm的颗粒数量≤600＝合格

[0473] 对于所有调配物，10μm的结果都略有夸大。冻干优化小瓶不经历与技术批次小瓶相同的清洁程序，且可能产生夸大的结果。

[0474] 所有结果均符合药典规格-每小瓶直径≥10μm的颗粒数量≤6000且每小瓶直径≥25μm的颗粒数量≤600。

[0475] 7.3.3.含水量

[0476] 使用甲醇作为溶剂通过卡尔费歇尔分析确定冻干塞的水分含量。每批分析来自重复小瓶的单个样品，表1-63。在添加无水甲醇期间未发现复原问题。

[0477] 表1-63.含水量

[0478]

样品	平均水(%w/w)
调配物1	0.71
调配物5	1.51
调配物6	1.47

[0479] 所有调配物均产生<5%的最佳水含量。在添加无水甲醇期间未发现复原问题。

[0480] 7.3.4.分析和纯度结果

[0481] 7.3.4.1.过滤前

[0482] 使用0.22μm PES膜针筒过滤器过滤样品。在过滤过程中没有观察到任何问题。错误的是,在冻干之前未收集过滤后样品,因此根据理论浓度报告结果。

[0483] 表1-64.过滤前和过滤后

[0484]

样品	过滤前[BT5528](mg/mL)	%回收率[1]
调配物1	3.64	91.0
调配物5	1.97	98.5
调配物6	1.91	95.5

[0485] [1]相对于调配物1的理论值4mg/mL以及调配物5和6的理论值2mg/mL的%回收率。

[0486] 表1-65.过滤前的纯度/相关物质

[0487]

RRT	调配物和量(面积%)		
	1	5	6
0.51	0.22	0.18	0.22
0.53	0.22	0.21	0.27
0.97	0.13	0.13	0.11
BT5528	98.35	98.63	98.61
1.10	0.55	0.61	0.51
1.30	0.11	0.11	0.14
总计[1]	**1.5**	**1.2**	**1.3**

[0488] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0489] 调配物5和6具有大于95%的相对于理论2mg/mL浓度的回收率。调配物1的回收率值相当低,为91%,表明2mg/mL的呈现可能更稳健。

[0490] 所有三种调配物的相关物质数据都是一致的。

[0491] 7.3.5.小瓶含量

[0492] 表1-66.冻干小瓶含量

[0493]

样品	小瓶 1[BT5528](毫克/小瓶)	小瓶 2 [BT5528](毫克/小瓶)	平均值[BT5528](毫克/小瓶)	%回收率[1]
调配物 1	19.75	19.65	19.70	92.9
调配物 5	21.53	21.74	21.63	102.0
调配物 6	21.11	20.92	21.01	99.1

[0494] [1]相对于理论21.2毫克/小瓶BT5528的%回收率。

[0495] 平均相关物质报道于表1-67中。

[0496] 表1-67.纯度/相关物质

[0497]

RRT	调配物和量(面积%)		
	1	5	6
0.51	0.19	0.18	0.17
0.53	0.26	0.24	0.23
0.97	0.15	0.15	0.14
BT5528	98.34	98.26	98.44
1.10	0.70	0.79	0.65
1.30	0.10	0.11	0.12
总计[1]	**1.4**	**1.5**	**1.3**

[0498] [1]相关物质的总和≥0.10%

[0499] 7.3.6.复原溶液

[0500] 用5.3mL WFI复原调配物1,得到4mg/mL的浓度。在10.6mL WFI中复原调配物5和6,得到2mg/mL的浓度。评估分析和纯度并与理论值进行比较。

[0501] 表1-68.复原的小瓶含量

[0502]

样品	小瓶 1 [BT5528] (mg/mL)	小瓶 2 [BT5528] (mg/mL)	平均值[BT5528] (mg/mL)	%回收率 [1]
调配物 1	2.98	3.25	3.11	77.8
调配物 5	1.84	1.88	1.86	93.0
调配物 6	1.79	1.84	1.81	90.5

[0503] [1]相对于理论4mg/mL和2mg/mL BT5528的%回收率。

[0504] 平均相关物质结果报道于表1-69中。

[0505] 表1-69.调配物1、5和6的纯度/相关物质。

[0506]

RRT	调配物和量(面积%)		
	1	5	6
0.51	0.28	0.23	0.20
0.53	0.31	0.29	0.27
0.97	0.15	0.14	0.12
BT5528	98.42	98.58	98.53
1.10	0.58	0.53	0.48
1.30	0.12	0.11	0.15
总计 [1]	**1.4**	**1.3**	**1.2**

[0507] 所有三种调配物的相关物质数据都是一致的。

[0508] 表1-69中的分析数据低于所有三种调配物的目标值。对于回收率约为78%的调配物1,情况明显更差。调配物1的BT5528浓度最高,为4mg/mL,且因此由于BT5528API的性质,最难完全复原。结果表明,较低的2mg/mL BT5528浓度是更有利的呈现,并且应考虑用于非GMP技术批次。

[0509] 7.4.结论

[0510] 冻干物的外观对于所评估的所有三种调配物都是类似的,白色、均质且有轻微收缩。BT5528浓度的变化和更高的填充体积不会影响产品的外观。

[0511] 2mg/mL溶液(调配物5和6)的复原时间比4mg/mL溶液(调配物1)快1分钟以上。两种聚山梨醇酯20浓度0.1和0.2mg/mL(分别为调配物5和6)的复原时间没有差异,表明聚山梨醇酯20不影响复原时间。

[0512] 调配物1的水分含量低于调配物5和6,这将是预期的,因为填充体积为一半。

[0513] 冻干前后或评估的三种调配物之间的纯度/相关物质没有差异。然而,相对于理论值的回收率存在差异。调配物1的分析值为理论值的77.8%(3.11mg/mL),相比之下,调配物5和6(1.86和1.18mg/mL)的分析值为91-93%,表明具有较低BT5528浓度的冻干产品的复原得到改善。

[0514] 8.过滤评估

[0515] 在GMP制造期间,本体溶液将被过滤灭菌(0.22μm孔径)。应调查与过滤器的兼容性以及吸附在滤膜和外壳上可能造成的材料损失。还将监测相关物质。

[0516] 已知体积的调配物(表1-71)经由蠕动泵和铂固化的硅树脂管穿过已知表面积的

专有“P”(药物)级过滤器胶囊,以评估单一类型膜上每cm2过滤器表面积的吸附损失;PES(聚醚砜)(Mini Kleenpak胶囊过滤器,KA02EKVP2S,表面积220cm^2)。

[0517] 评估过滤的容易程度,测量为过滤器上游的背压。通过UPLC确定预过滤器溶液和五个连续的早期滤液样品和最终本体滤液中的活性浓度和相关物质。还确定了预过滤器和滤液样品的pH。

[0518] 活性材料吸附到滤膜或胶囊表面上,如果发生的话,通常是可饱和现象。在确定了使特定类型的过滤器胶囊达到饱和的溶液体积后,这将成为所述特定胶囊的初始丢弃体积。一个有用的内部安排是确保过滤体积(mL)与总过滤器表面(cm_2)的比率为≥5。

[0519] 表1-70.过滤评估调配物组成(批号和调配物细节)

[0520]

过滤评估	2 mg/mL BT5528、5.24 mg/mL组氨酸HCl、60 mg/mL蔗糖、0.1 mg/mL聚山梨醇酯 20 (10.6 mL 填充-21.2 毫克/小瓶) 20 mL 小瓶

[0521] 8.1.溶液制备

[0522] 表1-70中详述的调配物以200mL规模制备。将大约140mL WFI添加到含有磁性搅拌棒的烧杯中。在冲洗下向其中添加约1.05g组氨酸,并磁力搅拌直至溶解。一旦溶解,称出12g蔗糖并在冲洗下加入,接着搅拌直到溶解。将2mL的1%(w/v)聚山梨醇酯20溶液移液到组氨酸/蔗糖溶液中并搅拌直至实现完全溶解。

[0523] 向溶液中称出约514mg BT5528并缓慢加入,接着搅拌90分钟直至完全溶解。测量溶液的pH并用1M氢氧化钠调节至pH 6.5,接着转移到200mL容量瓶中并用WFI定容。将溶液放回初始烧杯中并搅拌混合。

[0524] 8.2.过滤

[0525] 在过滤前保留溶液样品用于UPLC分析,且其余部分通过使用铂固化的硅树脂管和蠕动泵的单个0.22μm PES胶囊过滤器过滤。

[0526] 如下地在整个过滤过程中收集等分试样:

[0527] • 过滤前

[0528] • 0-10mL

[0529] • 10-20mL

[0530] • 20-30mL

[0531] • 30-40mL

[0532] • 40-50mL

[0533] • 本体滤液

[0534] 溶液易于过滤且背压低,所得滤液为不含可见颗粒的透明、无色溶液。

[0535] 通过UPLC分析等分试样的分析和相关物质,以确定滤膜上是否存在分析损失或指示与膜不相容的可提取物/可浸出物。

[0536] 8.3.结果

[0537] 表1-71.过滤样品小瓶含量

[0538]

样品	分析(mg/mL)	回收/理论[1] (%)	回收/过滤前[2] (%)
过滤前	2.03	101.5	-
前几 mL	1.77	88.5	87.2
10 - 20 mL	1.97	98.5	97.0
20 - 30 mL	1.98	99.0	97.5
30 - 40 mL	2.02	101.0	99.5
40 - 50 mL	2.06	103.0	101.5
本体溶液	2.04	102.0	100.5

[0539] [1]相对于理论2mg/mL BT5528的%回收率。

[0540] [2]相对于过滤前结果的%回收率

[0541] 表1-72.纯度/相关物质过滤评估

[0542]

RRT	体积和量(面积%)						
	过滤前	前几 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	本体
0.51	0.18	0.21	0.19	0.18	0.18	0.19	0.18
0.53	0.22	0.26	0.21	0.23	0.20	0.21	0.21
0.96	0.14	0.11	0.12	0.13	0.13	0.15	0.14
0.97	0.56	0.65	0.60	0.59	0.61	0.59	0.55
BT5528	97.94	98.18	98.28	98.17	98.16	98.11	98.27
1.10	0.61	0.47	0.57	0.64	0.65	0.67	0.46
总计[1]	**1.8**	**1.7**	**1.7**	**1.8**	**1.8**	**1.8**	**1.5**

[0543] 在最初的0-10mL样品穿过PES过滤器期间,注意到分析下降。这并不意外,且表明这种过滤器类型需要少量丢弃。在过滤0-10mL后达到可接受的回收率,并且总杂质没有显著变化。

[0544] PES过滤器因此适用于BT5528药品的制备。

[0545] 8.4.论述和结论

[0546] 通过PES胶囊过滤器过滤的溶液具有低背压,表明膜适合于过滤此溶液。

[0547] 收集的等分试样或本体溶液中的纯度/相关物质数据没有变化,表明不存在可提取物/可浸出物。

[0548] 分析数据显示在收集的第一等分试样(0-10mL)中BT5528浓度相对于理论值的回收率初始降低了88.5%,然而,在已过滤10-20mL之后分析返回到目标。这表明在非GMP技术批次中应使用每个过滤器10mL的丢弃体积。

[0549] 9.结论

[0550] 此报告已证明成功开发了用于推进到非GMP技术批次的稳定冻干调配物。

[0551] 进行了冻干循环优化,然而,由于BT5528吸附到小瓶表面的问题和复原的挑战,将一个更保守的循环推进到非GMP技术批次。

[0552] 进行过滤评估,其展示在过滤期间BT5528浓度的初始降低在10mL之后返回到目标。在非GMP技术批次中将使用每个过滤器10mL的丢弃体积。

[0553] 在单独的冻干循环中研究了BT5528吸附到小瓶表面的原因。许多假设被提出作为潜在原因:最终产品中的高氯化钠浓度、复原产品的更碱性pH、硅烷化的小瓶和肽的过度干燥。这些假设中的每一个都与替代糖、表面活性剂和较低BT5528浓度的调配物筛选一起评估,以研究这是否改善了复原特征。在较低pH预冻干的情况下获得了复原时间的改善,但是油滴仍保留在小瓶的表面上。

[0554] 氯化钠含量的降低、硅烷化小瓶的使用和较低的二次干燥温度(以增加产品的最终水分含量)并未改善复原特征。替代糖或表面活性剂没有产生改善,然而,发现将BT5528浓度从4mg/mL降低到2mg/mL可改善复原特征。复原时间减少,且复原后小瓶表面上没有观察到油滴。2mg/mL调配物相对于理论值的回收率处于目标值,相比之下,4mg/mL调配物始终低于目标值。

[0555] 基于对BT5528表面吸附的研究结果,并在与客户讨论后,选择了BT5528浓度为2mg/mL的先导调配物用于推进到非GMP技术批次。

[0556] 实例2.BT5528在与EphA2表达相关的晚期恶性肿瘤患者中的安全性、药物动力学和初步临床活性的I/II期研究

[0557] 2.1目标

[0558] 主要目标

[0559] 递增(A-1和A-2部分)的主要目标为:

[0560] • 评估BT5528在与EphA2表达相关的晚期实体肿瘤恶性肿瘤患者中作为单药疗法(A-1部分)和与纳武单抗组合使用(A-2部分)的安全性和耐受性

[0561] • 定义BT5528的最大耐受剂量(MTD),如果观察到,并确定作为单药疗法(A-1部分)和与纳武单抗组合使用(A-2部分)的推荐的II期剂量(RP2D)。

[0562] 扩展(B-1和B-2部分)的主要目标为:

[0563] • 使用RECIST 1.1评估BT5528在具有选定实体肿瘤适应症的患者中作为单药疗法(B-1部分)和与纳武单抗组合使用(B-2部分)的临床活性

[0564] 次要目标

[0565] 递增(部分A-1和A-2)本研究的次要目标为:

[0566] • 评估BT5528在与EphA2表达相关的晚期实体肿瘤恶性肿瘤患者中作为单药疗法(A-1部分)和与纳武单抗组合(A-2部分)施用时获得的抗肿瘤活性的初步信号

[0567] • 确定BT5528的药物动力学(PK)参数

[0568] • 确定抗药物抗体(ADA)发展的发生率

[0569] 扩展(B-1和B-2部分)研究的次要目标为:

[0570] • 评估BT5528在具有选定实体肿瘤适应症的患者中作为单药疗法(B-1部分)和与纳武单抗组合使用(B-2部分)的安全性和耐受性

[0571] • 确定BT5528的药物动力学(PK)参数

[0572] • 确定抗药物抗体(ADA)发展的发生率

[0573] 2.2.研究设计

[0574] 本研究是BT5528作为单一药剂(A-1和B-1部分)和与纳武单抗组合(A-2和B-2部分)给与的I/II期、首次用于人体的开放标签剂量递增研究。本研究分为两部分:A部分,剂量递增和B部分,剂量扩展。

[0575] 2.3.研究药物、剂量和施用方式:

[0576] BT5528以递增剂量在1小时内以输注形式静脉内施用。纳武单抗按照标签施用。

[0577] 2.4.纳入标准-所有患者:

[0578] 患者必须满足以下标准才能被纳入研究:

[0579] 1.根据当地指南,在执行任何研究特定程序、取样或分析之前,由患者或法定监护

人签署并注明日期的书面知情同意书。

[0580] 如果患者拒绝参加研究的任何自愿部分(例如,肿瘤活检),则不会对患者造成惩罚或损失利益,并且他/她不会在研究的其它方面被排除。

[0581] 2.签署知情同意书时年满18岁

[0582] 3.东部肿瘤协作组(ECOG)机能状态评分为0或1

[0583]

ECOG 机能状态量表		卡诺夫斯基机能量表(Karnofsky Performance Scale)	
级别	描述	百分比	描述
0	正常活动。充分活动，能够在无限制下进行所有疾病前的机能。	100	正常，无不适，无疾病迹象。
		90	能够进行正常的活动;轻微的疾病迹象或症状。
1	有症状，但可以走动。体力活动受限，但可以走动并能够进行轻度或久坐性质的工作(例如，轻松的家务活、办公室工作)。	80	正常活动费力;有一些疾病的迹象或症状。
		70	照顾自己,无法进行正常活动或做积极的工作。

[0584]

[0585] 4.根据实体肿瘤(RECIST)v1.1的反应评估标准,患者必须患有可测量的疾病,

[0586] 5.可接受的器官功能,由以下实验室数据证明:

[0587] -肾功能,如下:通过科克罗夫特-高尔特方程或通过24小时尿液收集测量的肌酐清除率≥50mL/min。

[0588] -总胆红素≤1.5×ULN(正常值上限)

[0589] -血清白蛋白≥2.5g/dL

[0590] -在存在肝转移的情况下,天冬氨酸转氨酶(AST)≤2.5×ULN或≤5×ULN

[0591] -在存在肝转移的情况下,丙氨酸转氨酶(ALT)≤2.5×ULN或≤5×ULN

[0592] -国际标准化比率(INR)<1.3或≤机构ULN(不允许抗凝剂)

[0593] 6.可接受的血液学功能(首剂BT5528后4周内不允许输注红细胞或血小板或生长因子):

[0594] -血红蛋白≥9g/dL

[0595] -绝对中性粒细胞计数(ANC)≥1500个细胞/mm^3

[0596] -血小板计数≥75,000个细胞/mm^3

[0597] 7.有生育潜力的女性(WOCBP)妊娠测试呈阴性(筛选时血清测试呈阴性和首剂BT5528之前3天内尿液或血清测试呈阴性。有生育潜力的女性伴侣的男性患者和有生育潜力的女性患者在其参与研究期间和最后一剂研究药物后的6个月内必须遵循高效避孕措施(允许口服和激素避孕),至少与临床试验促进组(CTFG)的建议一样保守,失败率低于1%(https://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/01-About_HMA/Working_Groups/CTFG/2014_09_HMA_CTFG_Contraception.pdf)。在最后一剂研究药物后的6个月内,男性患者在参与研究期间也必须避免捐献精子,且女性在此期间不得进行母乳喂养或捐献卵子。

[0598] 没有生育潜力的女性定义如下:

[0599] • 如果女性有12个月的自然(自发)闭经且具有适当的临床特征(例如,适当年龄、血管舒缩症状史),则认为她们已绝经且没有生育潜力。

[0600] • 永久绝育的女性(例如输卵管阻塞、子宫切除术、双侧输卵管切除术、双侧卵巢切除术)。

[0601] • 年龄>45岁、未使用激素替代疗法且经历完全停止月经至少12个月或促卵泡激素(FSH)值>40mIU/mL和雌二醇值<40pg/mL(140pmol/L)的女性。

[0602] • 年龄>45岁、使用激素替代疗法且经历完全停止月经至少1年或在激素替代疗法开始前有基于FSH>40mIU/mL和雌二醇<40pg/mL的绝经证据记录的女性。

[0603] 8.在首剂BT5528日期前9个月内存档肿瘤样品的可用性或在筛选期间提供新鲜肿瘤活检的意愿。

[0604] 9.根据研究者的判断,BT5528治疗开始后的预期寿命≥12周。

[0605] 10.必须愿意并能够遵守协议和研究程序。

[0606] 其它纳入标准-仅部分A

[0607] 1.患有历史上以EphA2高表达而闻名、在先前的疗法后复发的的晚期、组织学证实的恶性实体肿瘤(非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、三阴性乳腺癌(TNBC)、胃癌/上消化道(GI)癌、胰腺癌和尿道上皮癌)的患者,并且由于缺乏批准或标准的治疗选择而成为I期研究的候选者。如果患有其它肿瘤的患者在首剂BT5528的日期之前9个月内收集的肿瘤组织中提供高EphA2表达的证据,则所述患者可以纳入研究。如果认为有必要丰富对特定肿瘤类型的生物标志物、安全性或PK的评估,则SRC可决定在递增期间的任何时间点要求在纳入3.1.1中列出的肿瘤类型中登记特定肿瘤类型。

[0608] 额外纳入标准-B-1部分和B-2部分NSCLC单药疗法和组合群组

[0609] 1.患有组织学上确认为NSCLC的腺癌亚型(腺-NSCLC)的转移性复发性疾病的患者符合条件,且必须已用尽所有标准治疗选择,包括在基于铂的化学疗法期间或之后的进展,必须至少一种先前的治疗方案已失败,在最近的治疗方案上有放射线照相进展的证据。如果是EGFR、ALK、NTRK、ROS1或其它基因组肿瘤畸变,则必须不是驱动突变疾病的候选者或必须接受适当的驱动突变疾病治疗(如果适用)。如果先前接受过免疫疗法,则最后一剂必须在首剂BT5528之前至少28天。

[0610] 2.每个群组至少6名患者必须有至少1个适合活检的肿瘤病变,并且必须愿意在首剂BT5528之前和第1周期中的任何剂量后进行活检。

[0611] 2.5.排除标准-所有患者:

[0612] 满足以下任何标准的患者将被排除进入研究:

[0613] 1.首剂研究治疗之前14天内的化疗治疗、其它抗癌治疗、28天或5个半衰期(以较短者为准)内的治疗。根据不良事件通用术语标准(CTCAE)v 5.0,先前的毒性必须已解决至1级(脱发除外,其必须不超过2级)。

[0614] 2.在首剂BT5528的4周内的实验性治疗。

[0615] 3.目前使用CYP3A4的强抑制剂或诱导剂或P-gp的强抑制剂(包括草药或食物)的治疗。

[0616] 4.已知对研究产品或单甲基奥瑞他汀E(MMAE)的任何成分的敏感性。

[0617] 5.重大医学病况、危及生命的疾病、活动性不受控制的感染或器官系统功能障碍(例如腹水、凝血病、脑病),或研究者认为可能损害患者安全或干扰或损害研究结果完整性的其它原因,包括胃肠道、皮肤和肺部共病的考虑,且包括审查胸部CT筛查以确保没有临床

上显著的共病。

[0618] 6.首剂BT5528之后4周内进行大手术(不包括放置血管通路),并且必须在开始研究治疗前充分恢复

[0619] 7.在研究治疗的30天内接受活疫苗

[0620] 8.不受控制的、有症状的脑转移瘤(必须在不使用类固醇的情况下或在小于或等于10mg每日泼尼松或等效物的稳定或减少剂量下进行局部疗法后至少4周内具有稳定的神经状态,且不得患有将混淆神经和其它AE评估的神经功能障碍)。

[0621] 9.在首剂BT5528之前患有不受控制的高血压(收缩压[BP]≥139mmHg;舒张压≥89mmHg)的患者(必须已稳定控制至少3个月)

[0622] 10.任何在研究者看来可能混淆研究结果、干扰患者参与或不符合患者参与的最佳利益的任何状况、疗法或实验室异常的历史或当前证据,包括但不限于:

[0623] -在首剂BT5528之前6个月内,有记录的脑血管事件(中风或短暂性缺血发作)、不稳定性心绞痛、心肌梗塞、充血性心力衰竭或纽约心脏协会III-IV级症状的病史的患者,或:

[0624] i.平均静息校正QT间期(QTcF)>470毫秒

[0625] ii.任何增加QTc延长风险或心律失常事件风险的因素,例如心力衰竭、低钾血症、先天性长QT综合征、长QT综合征家族史或40岁以下不明原因猝死,或已知可延长QT间期的任何伴随药物

[0626] iii.静息心电图(ECG)的节律、传导或形态的任何临床上重要的异常(由研究者评估),例如完全左束支传导阻滞、三度心脏传导阻滞

[0627] 11.已知人类免疫缺陷病毒(HIV)或获得性免疫缺陷综合征(AIDS)

[0628] 12.乙型肝炎表面抗原和/或抗乙型肝炎核心抗体呈阳性的患者。允许聚合酶链反应(PCR)检测呈阴性的患者接受适当的抗病毒疗法

[0629] 13.如果丙型肝炎病毒(HCV)抗体呈阳性,则病毒负荷呈阳性的活动性丙型肝炎感染(如果抗体呈阴性,则病毒载量不适用)。接受过丙型肝炎感染治疗的患者如果记录到持续病毒学反应≥12周,则可以纳入研究。

[0630] 14.首剂BT5528之前3个月内的血栓栓塞事件和/或出血病症(例如,深静脉血栓形成[DVT]或肺栓塞[PE])。

[0631] 15.首剂BT5528之前3年内的另一恶性肿瘤病史,或任何来自先前诊断的恶性肿瘤的残留疾病的证据(不包括意图治愈的充分治疗的基底细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、宫颈上皮内瘤形成/宫颈原位癌或原位黑色素瘤或乳腺管原位癌)。

[0632] 16.首剂BT5528之前最近14天内的全身抗感染治疗或发热。

[0633] 17.不允许遵守方案和/或方案中概述的后续程序的心理、家庭、社会或地理条件。

[0634] 额外排除标准A-2和B-2部分纳武单抗组合群组

[0635] 1.既往对免疫检查点抑制剂不耐受

[0636] 2.已知对检查点抑制剂疗法过敏

[0637] 3.既往器官移植(包括同种异体)

[0638] 4.临床相关免疫缺陷的诊断

[0639] 5.需要治疗的活动性全身感染

[0640] 6.每天超过10mg的泼尼松等效物或其它强免疫抑制剂

[0641] 7.除脱发或白癜风外的自身免疫疾病病史

[0642] 8.间质性肺病病史

[0643] 2.6相关测试：

[0644] 将要求所有患者提供存档肿瘤材料或新鲜肿瘤活检以评估EphA2的表达水平和额外的分子遗传表征(即评估特定体细胞突变等)。此材料应以组织块或10-15个石蜡浸渍的未染色载玻片的形式提供。

[0645] 将收集给药前和给药后的肿瘤活检以研究BT5528的肿瘤内PK/药效学作用。对于所有患者，给药前和一次给药后肿瘤活检将是任选的，但对于B部分中的一部分患者(每组6人)将是强制性的。只要在BT5528给药后4至36小时内，在第1周期中任何给药后都将需要进行给药后活检。有关另外的细节，参看评估时间表(SOA)。

[0646] 还将收集给药前和给药后血液样品以评估药效学、反应和治疗抗性生物标志物，例如循环肿瘤DNA(ctDNA)、ADA和药物基因组分析中的体细胞突变。

[0647] 2.7.统计方法：

[0648] 剂量递增(分别适用于A-1和A-2)：本研究中要探索的剂量水平的实际数量将取决于基于剂量限制毒性(DLT)的不可耐受剂量的确定。MTD将基于DLT定义(参见第5节)。其它安全性数据，以及在研究进行期间观察到的PK概况和抗肿瘤活性的任何趋势将用于确定不会超过MTD的RP2D。

[0649] 3+3设计将用于前两个剂量水平。每个剂量水平将至少招募3名可评估患者，并将评估28天，然后才能递增至下一个剂量水平。在确认剂量水平1的耐受性后，将允许不超过100％的剂量递增至剂量水平2。治疗周期将根据SOA连续发生。如果一名患者经历DLT，则另外3名患者将接受相同剂量的治疗。在进行下一个剂量水平之前，需要对完成1个治疗周期(28天)的至少3名患者的群组进行评估。另外的细节见第5节。

[0650] 在前两个剂量水平的耐受性证据之后，所有后续剂量间隔递增将基于使用双参数贝叶斯逻辑回归模型(BLRM)的一种类型的连续再评估方法(CRM)和使用过量控制的递增(EWOC)原理，即下一个更高的递增剂量水平将在满足过量标准的剂量中包括DLT发生在目标间隔(20％,33％)中的最高后验概率，即存在≤25％的剂量水平被发现不安全的可能性(DLT率≥33％)。BLRM将应用于累积的DLT/安全性数据，且结果将可供SRC使用，且在审查这些数据后，SRC将就精确的剂量递增提出建议。第5节中提供了估计的递增方案，附录F:剂量递增设计的细节和操作特征中提供了完整的细节。

[0651] B部分的每个群组将采用西蒙(Simon)2阶段设计，其中p0＝0.175且p1＝0.35，单边α为0.05且幂为80％，其中p0和p1是总体反应率(ORR)的零假设和替代假设。如果招募的前14名患者中有3名或更多患者有客观反应(≥21％ORR)，则将向另外26名患者给药；否则，群组将被停止。

[0652] 因此，招募到研究中的患者的最大数量为152人；来自A-1部分的48人、来自A-2部分的24人和来自两个B部分群组中的每一个的40人。

序列表

<110> 拜斯科技术开发有限公司(BICYCLETX LIMITED)

<120> 对EphA2具有特异性的双环肽配体和其用途

<130> BIC-C-P2930PCT

<150> 62/940,966

<151> 2019-11-27

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(1)

<223> Xaa为B-Ala

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa为Sar10

<220>

<221> Xaa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa为HArg

<220>

<221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa为HyP

<220>

<221> Xaa

<222> (19)..(19)

<223> Xaa为HArg

<400> 1

Xaa Xaa Ala Xaa Asp Cys Xaa Leu Val Asn Pro Leu Cys Leu His Pro
1 5 10 15

Asp Trp Xaa Cys

20