



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113543811 A

(43) 申请公布日 2021.10.22

(21) 申请号 202080018514.3

(22) 申请日 2020.03.03

(30) 优先权数据

62/813,843 2019.03.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/020752 2020.03.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/180850 EN 2020.09.10

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 D·金 M·马洛

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

代理人 李程达

(51) Int.Cl.

A61K 47/42 (2017.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

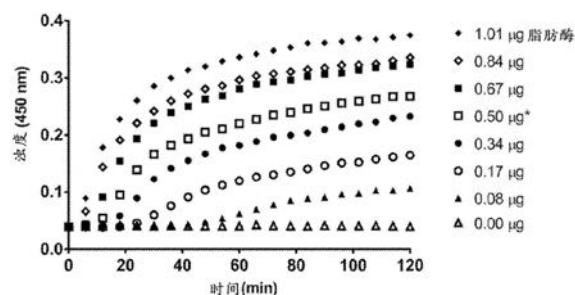
权利要求书2页 说明书20页 附图6页

(54) 发明名称

制剂中的人血清白蛋白

(57) 摘要

提供了药物制剂和用于去除、减少或防止药物制剂中的脂肪酸颗粒的形成的方法。



1. 一种防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法,所述制剂能够形成脂肪酸颗粒,所述方法包括向所述制剂中添加有效量的人血清白蛋白。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述制剂包含聚山梨酯。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述制剂包含一种或多种另外的蛋白质。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述脂肪酸颗粒包含游离脂肪酸。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述脂肪酸颗粒包含选自由以下组成的群组的游离脂肪酸:油酸、软脂酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸和它们的组合。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述制剂中的所述人血清白蛋白的浓度为至少约5.5mg/mL。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法减少包含具有约六个至约二十二个碳原子的游离脂肪酸的脂肪酸颗粒的形成。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述制剂是肠胃外制剂。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法减少形成可见或显微镜可见颗粒的脂肪酸颗粒。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中一摩尔所述人血清白蛋白结合所述脂肪酸颗粒中含有的至少半摩尔游离脂肪酸。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述脂肪酸颗粒的大小为至少10 $\mu$ m。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述脂肪酸颗粒通过拉曼光谱法检测。
13. 根据权利要求2所述的方法,其中所述聚山梨酯选自由以下组成的群组:聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯80和它们的组合。
14. 根据权利要求2所述的方法,其中所述制剂中的所述聚山梨酯的浓度为约0.001% w/v至约1% w/v。
15. 根据权利要求3所述的方法,其中所述另外的蛋白质是抗体。
16. 根据权利要求3所述的方法,其中所述另外的蛋白质是单克隆抗体。
17. 根据权利要求3所述的方法,其中所述另外的蛋白质是多克隆抗体。
18. 根据权利要求5所述的方法,其中所述制剂中所述游离脂肪酸分子与所述人血清白蛋白分子的比为约6:1至约1:1。
19. 一种溶解制剂中形成的脂肪酸颗粒的方法,所述方法包括向所述制剂中添加有效量的人血清白蛋白。
20. 一种制剂,包含:  
活性药剂,  
聚山梨酯,和  
人血清白蛋白。
21. 根据权利要求20所述的蛋白质制剂,其中所述活性药剂包含单克隆抗体。
22. 根据权利要求20所述的蛋白质制剂,其中所述活性药剂包含多克隆抗体。
23. 根据权利要求20所述的蛋白质制剂,其中所述活性药剂包含治疗性抗体。
24. 根据权利要求20所述的蛋白质制剂,其中所述聚山梨酯选自由以下组成的群组:聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯80和它们的组合。
25. 根据权利要求20所述的蛋白质制剂,其中所述制剂进一步包含脂肪酶。

26. 根据权利要求20所述的蛋白质制剂,其中所述蛋白质制剂中的所述人血清白蛋白的浓度为至少约5.5mg/mL。

27. 根据权利要求20所述的蛋白质制剂,其中所述制剂是肠胃外制剂。

28. 根据权利要求20所述的蛋白质制剂,其中所述聚山梨酯降解形成脂肪酸颗粒。

29. 根据权利要求28所述的蛋白质制剂,其中所述脂肪酸颗粒包含游离脂肪酸。

30. 根据权利要求29所述的蛋白质制剂,其中所述游离脂肪酸是具有约六个至约二十二个碳的脂肪酸。

31. 根据权利要求29所述的蛋白质制剂,其中所述游离脂肪酸是油酸。

32. 根据权利要求29所述的蛋白质制剂,其中所述游离脂肪酸选自自由以下组成的群组:油酸、软脂酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸和它们的组合。

33. 根据权利要求29所述的蛋白质制剂,其中所述制剂中所述游离脂肪酸分子与所述人血清白蛋白分子的比为约6:1至约1:1。

34. 根据权利要求20所述的蛋白质制剂,其中所述蛋白质制剂中的所述聚山梨酯的浓度为约0.001%w/v至1%w/v。

## 制剂中的人血清白蛋白

### 技术领域

[0001] 本发明总体上涉及用于去除、减少或防止药物制剂中的脂肪酸颗粒的形成的方法。

### 背景技术

[0002] 在设计药物制剂以改善其制造、储存、处理和施用特性并同时最大限度地减少有害副作用方面存在许多挑战。举例来说，制剂开发力求鉴别增加稳定性并且减少发生化学或物理变化的溶液条件和添加剂或赋形剂，所述变化通常会导致聚集，并且可能随之导致显微镜可见颗粒或可见颗粒增加。

[0003] 防止和减少配制的可注射药物产品中的颗粒形成一直特别具有挑战性，并且数年来一直是制药行业争论和调查研究的焦点。由合成材料或生物材料组成并且源于各种来源的可见或甚至显微镜可见的颗粒会提高患者的免疫原性可能性，并且可能对药物产品质量具有不同的影响。一种此类可能的杂质可能是在制造、运输、储存、处理或施用期间形成的脂肪酸颗粒。脂肪酸颗粒可能会引起不利的免疫原性作用，并且影响保质期。

[0004] 应了解，需要减少或防止蛋白质制剂中的脂肪酸颗粒形成的改良方法，并且需要脂肪酸颗粒水平降低的蛋白质制剂。

### 发明内容

[0005] 不仅在储存期间而且在制造、运输、处理和施用期间，保持药物制剂的稳定性都是一项重大挑战。在药物产品中，蛋白质生物治疗剂因其成效和多功能性而越来越受欢迎。治疗性蛋白是增长最快的一类药物，并且约占药物市场的三分之一。蛋白质生物治疗剂开发的主要挑战之一是要克服蛋白质的稳定性限制，所述稳定性可能因存在可见颗粒和显微镜可见颗粒而受影响。这是由于对颗粒—蛋白质颗粒和非蛋白质颗粒的潜在免疫原性的关注越来越多。减轻这类颗粒的形成可能是药物制剂开发中的一个重要步骤。一个挑战的实例是防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒的形成。

[0006] 本公开提供一种防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法。

[0007] 在一个示例性实施方案中，防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中。

[0008] 在本实施方案的一个方面，防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将有效量的人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中

[0009] 在本实施方案的一个方面，防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂可以包含聚山梨酯。

[0010] 在本实施方案的一个方面，防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂包含选自以下组成的组的聚山梨酯：聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯80和

它们的组合。

[0011] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂包含约0.001%w/v至约1%w/v的聚山梨酯。

[0012] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂包含聚山梨酯和至少一种蛋白质。

[0013] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂包含聚山梨酯和抗体。

[0014] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中脂肪酸颗粒包含游离脂肪酸。

[0015] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中脂肪酸颗粒包含游离脂肪酸,并且其中游离脂肪酸分子与人血清白蛋白分子的比可以为约6:1至约1:1。

[0016] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中脂肪酸颗粒包含选自以下组成的组的游离脂肪酸:油酸、棕榈酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸和它们的组合。

[0017] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中制剂可以包含至少约5.5mg/mL的人血清白蛋白。

[0018] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中制剂可以是肠胃外制剂。

[0019] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中脂肪酸颗粒是可见颗粒或显微镜可见的颗粒。

[0020] 在本实施方案的一个方面,防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中脂肪酸颗粒可以通过拉曼光谱法(Raman spectroscopy)检测。

[0021] 本公开至少部分地提供了一种溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法。

[0022] 在一个示例性实施方案中,溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中。

[0023] 在本实施方案的一个方面,溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将有效量的人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中。

[0024] 在本实施方案的一个方面,溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂可以包含聚山梨酯。

[0025] 在本实施方案的一个方面,溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中,其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂可以包含选自

由以下组成的组的聚山梨酯：聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯80和它们的组合。

[0026] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂可以包含约0.001%w/v至约1%w/v的聚山梨酯。

[0027] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂可以包含聚山梨酯和至少一种蛋白质。

[0028] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中能够形成脂肪酸颗粒的制剂包含聚山梨酯和抗体。

[0029] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中脂肪酸颗粒可以包含游离脂肪酸。

[0030] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中脂肪酸颗粒可以包含游离脂肪酸，并且其中游离脂肪酸分子与人血清白蛋白分子的比可以为约6:1至约1:1。

[0031] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中脂肪酸颗粒可以包含选自由以下组成的组的游离脂肪酸：油酸、棕榈酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸和它们的组合。

[0032] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将至少约5.5mg/mL的人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中

[0033] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中制剂可以是肠胃外制剂。

[0034] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中脂肪酸颗粒是可见颗粒或显微镜可见的颗粒。

[0035] 在本实施方案的一个方面，溶解制剂中的脂肪酸颗粒的方法可以包括将人血清白蛋白添加到能够形成脂肪酸颗粒的制剂中，其中脂肪酸颗粒可以通过拉曼光谱法检测。

[0036] 本公开至少部分地提供了一种制剂，所述制剂包含(i)活性药剂和(ii)人血清白蛋白。

[0037] 在一个示例性实施方案中，制剂可以包含(i)活性药剂、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯。

[0038] 在本实施方案的一个方面，制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯。

[0039] 在本实施方案的一个方面，制剂可以包含(i)活性药剂、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯，所述聚山梨酯选自由以下组成的组：聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯80或它们的组合。

[0040] 在本实施方案的一个方面，制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯，其中制剂可以通过肠胃外途径施用。

[0041] 在本实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白、(iii)聚山梨酯和(iv)脂肪酶。

[0042] 在本实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)活性药剂和(ii)至少约5.5mg/mL的人血清白蛋白。

[0043] 在本实施方案的一个方面,该制剂可以包含(i)活性药剂、(ii)至少约5.5mg/mL的人血清白蛋白和(iii)约0.001%w/v至约1%w/v的聚山梨酯。

[0044] 在本实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)活性药剂、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯,其中制剂可以进一步包含具有游离脂肪酸的脂肪酸颗粒,并且其中游离脂肪酸分子与人血清白蛋白分子之比可为约6:1至约1:1。

[0045] 在本实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯,其中聚山梨酯可以降解形成脂肪酸颗粒。

[0046] 在本实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白、(iii)聚山梨酯和(iv)脂肪酶,其中脂肪酶可以使聚山梨酯水解形成脂肪酸颗粒。

[0047] 在本实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯,其中制剂可以进一步包含脂肪酸颗粒。

[0048] 在本实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯,其中制剂可以进一步包含脂肪酸颗粒,所述脂肪酸颗粒包括游离脂肪酸。

[0049] 在本实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯,其中制剂可以进一步包含脂肪酸颗粒,所述脂肪酸颗粒包括具有约六个至约二十个碳的脂肪族脂肪酸。

[0050] 在本实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯,其中制剂可以进一步包含脂肪酸颗粒,所述脂肪酸颗粒包括油酸。

[0051] 在该实施方案的一个方面,制剂可以包含(i)抗体、(ii)人血清白蛋白和(iii)聚山梨酯,其中该制剂可以进一步包含脂肪酸颗粒,所述脂肪酸颗粒包括选自以下的游离脂肪酸:油酸、棕榈酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸和它们的组合。

[0052] 当结合以下描述和附图考虑时,将更好地了解和理解本发明的这些方面和其它方面。以下描述在指示各种实施方案和它们的许多具体细节时是以说明而非限制的方式给出。可以在本发明的范围内进行许多替换、修改、添加或重排。

## 附图说明

[0053] 图1显示根据示例性实施方案的脂肪酶浓度在450nm处的吸光度随时间变化的图,以评估粘稠色杆菌脂肪酶(*Chromobacterium viscosum* lipase)通过促进PS80降解产生脂肪酸颗粒的能力。

[0054] 图2显示拉曼强度(任意单位)随拉曼位移(1/cm)变化的图,以鉴别归因于根据示例性实施方案制备的脂肪酸的颗粒的组成。

[0055] 图3显示在添加到根据示例性实施方案制备的含有聚山梨酯的溶液中的各种FAF-HSA浓度下,在450nm处的吸光度随时间变化的图。

[0056] 图4显示在添加到根据示例性实施方案制备的含有聚山梨酯的溶液中的各种SA-HSA浓度下,在450nm处的吸光度随时间变化的图。

[0057] 图5显示在不添加HSA的情况下,在各种多克隆IgG浓度下,在450nm处的吸光度随时间变化的图。

[0058] 图6显示包含未冻干(图A)和冻干(图B)的单克隆抗体的制剂在450nm处的吸光度随时间变化的图。

[0059] 图7显示根据示例性实施方案,在将4.5mg/mL FAF-HSA(图A)和7.5mg/mL FAF-HSA(图B)添加到各种多克隆IgG浓度时,在450nm处的吸光度随时间变化的图。

[0060] 图8显示根据示例性实施方案,在添加到预形成的脂肪酸颗粒中的各种血清浓度下,在450nm处的吸光度随时间变化的图。

[0061] 图9显示在溶液中包含人血清和预形成的游离脂肪酸颗粒的制剂在450nm处的吸光度随时间变化的图。

### 具体实施方式

[0062] 在药物产品中,基于蛋白质的生物治疗剂是一类提供高水平的选择性、效力和功效的重要药物,过去几年单克隆抗体(mAb)的临床试验显著增加就证明了这一点。将基于蛋白质的生物治疗剂用于临床可能是一项多年的工作,需要各个研究和开发科目,包括发现、处理与制剂开发、分析表征以及临床前毒理学与药理学的协调努力。临床和商业上可行的生物治疗剂的一个关键方面是药物产品在制造过程以及保质期方面的稳定性。与许多纯化蛋白质类似,mAb的天然构象稳定性相对较差,通常约为20至25kcal/mol(Kristi L.Lazar、Thomas W.Patapoff和Vikas K.Sharma,Cold denaturation of monoclonal antibodies, 2MABS 42-52(2010))。通常需要采取适当的步骤来帮助提高mAb在制造和储存所需的不同溶液条件和环境中的物理和化学稳定性,同时将对产品质量的影响减到最小,所述步骤包括鉴别具有较高固有稳定性的分子、蛋白质工程和制剂开发。制剂开发力求鉴别增加mAb稳定性并且减少发生化学或物理变化的溶液条件和添加剂或赋形剂,这些变化通常会导致聚集,并且可能随之导致显微镜可见颗粒或可见颗粒增加。

[0063] 特别是配制的药物产品中的可见颗粒和显微镜可见颗粒,数年来一直是制药行业内讨论和调查研究的焦点,并且可能引起质量问题。由合成材料或生物材料组成并且源于各种来源的颗粒提高了患者的免疫原性作用的可能性(S.Bukofzer等人,Industry Perspective on the Medical Risk of Visible Particles in Injectable Drug Products,69PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 123-139(2015);S.E.Langille,Particulate Matter in Injectable Drug Products,67PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 186-200(2013))并且可能对药物产品产生不同的作用。制剂中的可见颗粒和显微镜可见颗粒的形成可能有若干原因,所述颗粒可能包括蛋白质颗粒和非蛋白质颗粒。这类颗粒可能会导致越来越多关于潜在免疫原性的问题。尽管美国药典(United States Pharmacopeia;USP)和欧洲药典(European Pharmacopoeia;Ph.Eur.)目前仅限定了针对大于10 $\mu$ m的颗粒在肠胃外溶液中的浓度限制,但监管机构越来越希望对已处于开发阶段早期的1到10 $\mu$ m的微米颗粒进行定量表征并且对100nm到1000nm的亚微米颗粒进行定性表征(USP<788>.在:The United States Pharmacopoeia,National Formulary.2009;Ph.Eur.2.9.19)。

[0064] 药物制剂中的可见颗粒和显微镜可见颗粒可能与游离脂肪酸含量和随后的脂肪

酸颗粒形成相关。游离脂肪酸和相关的脂肪酸颗粒形成可能出现在包含聚山梨酯的蛋白质制剂中。超过70%的市售单克隆抗体治疗剂含有0.001%至0.1%的聚山梨酯,以保护蛋白质免受界面应力的影响,例如吸附和聚集的影响。许多聚山梨酯制剂含有棕榈酸各种脂肪酸链的混合物;例如,聚山梨酯80含有油酸、棕榈酸、肉豆蔻酸和硬脂酸脂肪酸,其中单油酸酯级分约占多分散性混合物的58% (Nitin Dixit等人,Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles,105JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016))。聚山梨酯易以pH和温度依赖性方式自氧化,另外,暴露于UV光也会产生不稳定性 (Ravuri S.k.Kishore等人,Degradation of Polysorbates 20and 80:Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis,100JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 721-731 (2011)),从而在溶液中产生游离脂肪酸与山梨聚糖头基。因此,由于自氧化和水解,聚山梨酯可以促进颗粒形成,从而导致游离脂肪酸和随后的脂肪酸颗粒形成。各种宿主细胞蛋白,例如类磷脂酶B 2 (PLBL2) 和脂蛋白脂肪酶 (Josephine Chiu等人,Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein,lipoprotein lipase,for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations,114BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 1006-1015 (2016))使聚山梨酯水解可能在某些条件下产生游离脂肪酸 (Nitin Dixit等人,Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles,105JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016))。由PS20的降解产生的这些游离脂肪酸和类似的长链脂肪酸 (硬脂酸、油酸、棕榈酸等) 由于低溶解度而沉淀 (Nidhi Doshi、Barthélemy Demeule和Sandeep Yadav,Understanding Particle Formation:Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations,12MOLECULAR PHARMACEUTICS 3792-3804 (2015);Steven R.Labrenz,Ester Hydrolysis of Polysorbate 80in mAb Drug Product:Evidence in Support of the Hypothesized Risk After the Observation of Visible Particulate in mAb Formulations,103JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2268-2277 (2014)),这在当前模型中可能会导致药物中的脂肪酸颗粒形成。

[0065] 一些报告已详细说明了含有聚山梨酯20或聚山梨酯80的药物产品中存在可见颗粒和显微镜可见颗粒 (Xiaolin Cao等人,Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations,Part 1:Microspectroscopic Identification,104JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 433-446 (2015);Christine C.Siska等人,Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations,Part 2:Contribution of Polysorbate Raw Material,104JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 447-456 (2015);Nidhi Doshi、Barthélemy Demeule和Sandeep Yadav,Understanding Particle Formation:Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations,12MOLECULAR PHARMACEUTICS 3792-3804 (2015);Nitin Dixit等人,Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles,105JOURNAL

OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016); Anthony Tomlinson等人, Polysorbate 20 Degradation in Biopharmaceutical Formulations: Quantification of Free Fatty Acids, Characterization of Particulates, and Insights into the Degradation Mechanism, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3805-3815 (2015); Troii Hall等人, Polysorbates 20 and 80 Degradation by Group XV Lysosomal Phospholipase A 2 Isomer X1 in Monoclonal Antibody Formulations, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1633-1642 (2016)。通过光谱法表征并且显示由脂肪酸 (Nidhi Doshi, Barthelemy Demeule 和 Sandeep Yadav, Understanding Particle Formation: Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20 Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3792-3804 (2015); Anthony Tomlinson 等人, Polysorbate 20 Degradation in Biopharmaceutical Formulations: Quantification of Free Fatty Acids, Characterization of Particulates, and Insights into the Degradation Mechanism, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3805-3815 (2015)、纯蛋白质 (Xiaolin Cao 等人, Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations, Part 1: Microspectroscopic Identification, 104 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 433-446 (2015)) 或脂肪酸与蛋白质的混合物构成的颗粒表明聚山梨酯水解可以直接促成所配制药物产品中的颗粒的出现。宿主细胞蛋白, 特别是脂肪酶被看作可能的根本原因 (Nitin Dixit 等人, Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016))。因此, 虽然根据当前美国药典 (USP), 残留宿主细胞蛋白质的标准是 < 100 ppm (Catalin Doneanu 等人, Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, 4 MABS 24-44 (2012)), 但是微量宿主细胞脂肪酶的存在可能导致聚山梨酯水解, 从而导致释放游离长链脂肪酸。此外, USP 提出的颗粒含量标准限制为颗粒大小超过 10  $\mu$ m 时 6000 个颗粒/容器, 以及颗粒大小超过 25  $\mu$ m 时 600 个颗粒/容器 (USP General Chapter 788, Particulate Matter in Injections), 这表明宿主细胞脂肪酶的存在可能会影响保质期 (S. Bukofzer 等人, Industry Perspective on the Medical Risk of Visible Particles in Injectable Drug Products, 69 PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 123-139 (2015))。

[0066] 聚山梨酯制剂的整体均匀性以及聚山梨酯固有的长期稳定性会引入与游离脂肪酸含量相关的问题。虽然含有脂肪酸颗粒的药物产品的安全性和有效性尚未得到充分评估, 但避免潜在的质量问题显然是有利的。虽然尚不清楚脂肪酸颗粒是否会引起患者的免疫原性响应, 但药物产品中的颗粒通常被认为是不合需要的。

[0067] 在不存在减少脂肪酸颗粒形成或使预形成颗粒快速且彻底溶解的已知方法的情况下, 如本文所公开开发了有效且高效的方法和制剂。还公开了一种快速产生脂肪酸颗粒的实验系统和一种人血清白蛋白在生物治疗制剂背景下的新用途。

[0068] 除非另有描述, 否则本文所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所理解相同的含义。虽然在实践或测试中可以使用与本文所描述的那些

方法和材料类似或等同的任何方法和材料,但现在描述特定的方法和材料。所提及的所有出版物特此通过引用并入。

[0069] 术语“一个/种(a)”应理解为意指“至少一个/种”;并且术语“约”和“大约”应理解为允许存在如本领域的普通技术人员应理解的标准差;并且在提供范围时,包括端点。

[0070] 由于生物治疗剂中存在脂肪酸颗粒可能是所有行业伙伴(从企业到监管机构到供应商和患者)的一个重大问题,因此防止和/或减少这类脂肪酸颗粒形成的方法和能够使这类脂肪酸颗粒含量降低以及/或者防止这类脂肪酸颗粒形成的制剂在药物开发中是重要的。

[0071] 在一些示例性实施方案中,本公开提供了一种脂肪酸颗粒含量降低并且/或者能够防止这类脂肪酸颗粒形成的制剂,所述制剂包含活性药剂。

[0072] 如本文所用,术语“制剂”是指与一种或多种药学上可接受的媒介物配制在一起的活性药剂。

[0073] 如本文所用,术语“活性药剂”可以包括药物产品的生物活性组分。活性药剂可以是指药物产品中所使用的任何物质或物质的组合,其旨在在疾病诊断、治愈、减轻、治疗或预防中提供药理学活性或者产生直接作用,或者在恢复、调整或改变动物生理功能中产生直接作用。制备活性药剂的非限制性方法可以包括使用发酵过程、重组DNA、从天然资源中分离和回收、化学合成或它们的组合。

[0074] 在一些示例性实施方案中,活性药剂可以是蛋白质。

[0075] 如本文所用,术语“蛋白质”可以包括具有共价连接的酰胺键的任何氨基酸聚合物。蛋白质包含一个或多个氨基酸聚合物链,在本领域中通常称为“多肽”。“多肽”是指由氨基酸残基、相关的天然存在的结构变体和其通过肽键连接的合成的非天然存在的类似物构成的聚合物、相关的天然存在的结构变体以及其合成的非天然存在的类似物。“合成的肽或多肽”是指非天然存在的肽或多肽。合成的肽或多肽可例如使用自动化多肽合成仪来合成。本领域的技术人员已知各种固相肽合成方法。蛋白质可以含有一种或多种多肽以形成单一功能生物分子。蛋白质可包括生物治疗性蛋白、用于研究或治疗的重组蛋白、trap蛋白和其它嵌合受体Fc融合蛋白、嵌合蛋白、抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、人类抗体和双特异性抗体中的任一种蛋白质。在另一个示例性方面,蛋白质可以包括抗体片段、纳米抗体、重组抗体嵌合体、细胞因子、趋化因子、肽激素等。蛋白质可使用基于重组细胞的产生系统来产生,例如昆虫杆状病毒(baculovirus)系统、酵母系统(例如,毕赤酵母属某种(*Pichia* sp.))、哺乳动物系统(例如,CHO细胞和CHO衍生物,如CHO-K1细胞)。对于最近讨论生物治疗性蛋白及其产生的综述,参见Ghaderi等人,“Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation” (Darius Ghaderi等人, Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147-176 (2012))。在一些实施方案中,蛋白质包含修饰、加合物和其它共价连接的部分。这些修饰、加合物和部分包括例如亲和素、链霉亲和素、生物素、聚糖(例如,N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、神经氨酸、N-乙酰葡萄糖胺、岩藻糖、甘露糖和其它单糖)、PEG、聚组氨酸、FLAG标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)、几丁质结合蛋白(CBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)myc表位、荧光标记和其它染料等。蛋白质可以根

据组成和溶解度来分类,并且因此可以包括:单纯蛋白质,例如球状蛋白和纤维状蛋白;缀合蛋白,例如核蛋白、糖蛋白、粘蛋白、色蛋白、磷蛋白、金属蛋白和脂蛋白;以及衍生蛋白,例如一级衍生蛋白和二级衍生蛋白。

[0076] 在一些示例性实施方案中,蛋白质可以是抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、抗体片段、单克隆抗体或它们的组合。

[0077] 如本文所用,术语“抗体”包括包含通过二硫键相互连接的四条多肽链、两条重(H)链和两条轻(L)链的免疫球蛋白分子及其多聚体(例如IgM)。每条重链包含重链可变区(本文中缩写为HCVR或 $V_H$ )和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域 $C_H1$ 、 $C_H2$ 和 $C_H3$ 。每条轻链包含轻链可变区(本文中缩写为LCVR或 $V_L$ )和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域( $C_L1$ )。 $V_H$ 区和 $V_L$ 区可进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,穿插有被称为构架区(FR)的更保守区域。每个 $V_H$ 和 $V_L$ 由三个CDR和四个FR构成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。在本发明的不同实施方案中,抗大ET-1抗体(或其抗原结合部分)的FR可能与人类种系序列相同,或可能是天然或人工修饰的。氨基酸共有序列可以基于两个或更多个CDR的并行分析来限定。

[0078] 如本文所使用,术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程的多肽或糖蛋白。可以使用例如蛋白水解消化或重组基因工程技术的任何合适标准技术,例如从完整抗体分子衍生出抗体的抗原结合片段,所述重组基因工程技术涉及编码抗体可变结构域和任选恒定结构域的DNA的操纵和表达。此DNA为已知的和/或可容易地从例如商业来源、DNA库(包括例如噬菌体抗体库)获得或可以合成。可以用化学方式或通过使用分子生物学技术对DNA进行测序和操纵,例如将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型,或引入密码子、形成半胱氨酸残基、修饰、添加或删除氨基酸等。

[0079] 如本文所用,“抗体片段”包括完整抗体的一部分,例如抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、scFv片段、Fv片段、dsFv双抗体、dAb片段、Fd'片段、Fd片段和分离的互补决定区(CDR)区域,以及由抗体片段形成的三抗体、四抗体、线性抗体、单链抗体分子和多特异性抗体。Fv片段是免疫球蛋白重链和轻链的可变区的组合,并且ScFv蛋白为重组单链多肽分子,其中免疫球蛋白轻链可变区和重链可变区通过肽接头连接。在一些示例性实施方案中,抗体片段含有足够的亲本抗体的氨基酸序列,它是结合与亲本抗体所结合抗原相同的抗原的片段;在一些示例性实施方案中,片段以与亲本抗体相当的亲和力结合抗原以及/或者与亲本抗体竞争结合于抗原。抗体片段可以通过任何方式产生。举例来说,抗体片段可以通过完整抗体的片段化来以酶促或化学方式产生,并且/或者其可以由编码部分抗体序列的基因以重组方式产生。或者或另外,抗体片段可以整体或部分地以合成方式产生。抗体片段可以任选地包含单链抗体片段。或者或另外,抗体片段可以包含例如通过二硫键连接在一起的多条链。抗体片段可以任选地包含多分子复合物。功能性抗体片段通常包含至少约50个氨基酸,并且更通常包含至少约200个氨基酸。

[0080] 短语“双特异性抗体”包括能够选择性结合两个或大于两个表位的抗体。双特异性抗体通常包含两条不同的重链,其中每条重链特异性结合不同的表位—在两个不同分子

(例如,抗原)上或在同一分子上(例如,在同一抗原上)。如果双特异性抗体能够选择性地结合两个不同的表位(第一表位和第二表位),那么第一重链对第一表位的亲和力通常将比第一重链对第二表位的亲和力低至少一个到两个或三个或四个数量级,并且反之亦然。由双特异性抗体识别的表位可以在相同或不同的靶点上(例如,在相同或不同的蛋白质上)。双特异性抗体可以例如通过组合识别同一抗原的不同表位的重链来产生。举例来说,编码识别同一抗原的不同表位的重链可变序列的核酸序列可以与编码不同重链恒定区的核酸序列融合,并且这类序列可以在表达免疫球蛋白轻链的细胞中表达。

[0081] 典型的双特异性抗体具有两条重链和一条免疫球蛋白轻链,每条重链具有三个重链CDR,随后是 $C_H1$ 结构域、铰链、 $C_H2$ 结构域和 $C_H3$ 结构域,所述免疫球蛋白轻链不赋予抗原结合特异性,但可以与每条重链缔合,或者可以与每条重链缔合并且可以结合由重链抗原结合区结合的一个或多个表位,或者可以与每条重链缔合并且能够结合或一个或两个重链或一个或两个表位。BsAb可分为两大类,一类带有Fc区(IgG样),另一类缺少Fc区,后者通常小于包含Fc的IgG和IgG样双特异性分子。IgG样bsAb可以具有不同的形式,例如但不限于 triomab、旋钮入孔(knobs into holes) IgG(kih IgG)、crossMab、orth-Fab IgG、双可变结构域Ig(DVD-Ig)、二合一或双作用Fab(DAF)、IgG单链Fv(IgG-scFv)或 $\kappa\lambda$ -体。非IgG样的不同形式包括串联scFv、双功能抗体(Diabody)形式、单链双功能抗体、串联双功能抗体(TandAb)、双亲和重定向分子(Dual-affinity retargeting molecule;DART)、DART-Fc、纳米抗体或由对接锁定(dock-and-lock;DNL)方法产生的抗体(Gaowei Fan、Zujian Wang和Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY&ONCOLOGY 130; Dafne Müller和Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265-310 (2014))。

[0082] 产生BsAb的方法不限于基于两种不同杂交瘤细胞系的体细胞融合的四源杂交瘤(quadroma)技术、涉及化学交联剂的化学缀合和利用重组DNA技术的遗传方法。bsAb的实例包括在以下专利申请中公开的那些bsAb,所述专利申请特此通过引用并入:2010年6月25日提交的序列号为12/823838的美国专利申请;2012年6月5日提交的序列号为13/488628的美国专利申请;2013年9月19日提交的序列号为14/031075的美国专利申请;2015年7月24日提交的序列号为14/808171的美国专利申请;2017年9月22日提交的序列号为15/713574的美国专利申请;2017年9月22日提交的序列号为15/713569的美国专利申请;2016年12月21日提交的序列号为15/386453的美国专利申请;2016年12月21日提交的序列号为15/386443的美国专利申请;2016年7月29日提交的序列号为15/22343的美国专利申请;以及2017年11月15日提交的序列号为15814095的美国专利申请。在双特异性抗体的制造期间,在几个步骤中可能存在较低含量的同二聚体杂质。由于同二聚体杂质的低丰度,并且在使用常规液相色谱方法进行这些杂质与主要物质的共洗脱,因此使用完整质量分析进行这类同源二聚体杂质的检测可能具有挑战性。

[0083] 如本文所用,“多特异性抗体”或“Mab”是指对至少两种不同抗原具有结合特异性的抗体。虽然这类分子通常将仅结合两种抗原(即双特异性抗体, BsAb),但具有额外特异性的抗体,例如三特异性抗体和KIH Trispecific,也可以通过本文所公开的系统和方法来处理。

[0084] 如本文所用,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。单克隆抗体

可以通过本领域可获得的或已知的任何手段由单个纯系衍生,所述纯系包括任何真核、原核或噬菌体纯系。本公开可用的单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术来制备,所述技术包括使用杂交瘤、重组和噬菌体呈现技术或它们的组合。

[0085] 在一些示例性实施方案中,制剂可以包含活性药剂,其中活性药剂可以是小分子。如本文所用,术语“小分子”可以指分子量小于1500kDa的低分子量化合物。

[0086] 在一些示例性实施方案中,制剂可以是蛋白质制剂。

[0087] 如本文所用,术语“蛋白质制剂”是指可以与一种或多种药学上可接受的媒介物配制在一起的治疗性蛋白。在一些实施方案中,治疗性蛋白可以按适于在治疗方案中施用的单位剂量存在。

[0088] 在一些其它实施方案中,制剂可以进一步包含赋形剂,所述赋形剂包括但不限于缓冲剂、填充剂、张力调节剂、表面活性剂、增溶剂和防腐剂。也可以根据功能和与制剂的相容性来选择其它另外的赋形剂,可以见于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy.第十九版(Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995);Hoover,John E., Remington's Pharmaceutical Sciences,(Easton,Pa.:Mack Publishing Co 1975); Liberman,H.A.和Lachman,L.编,Pharmaceutical Dosage Forms(New York,N.Y.:Marcel Decker 1980);和Pharmaceutical Dosage Forms和Drug Delivery Systems,第七版(Lippincott Williams&Wilkins 1999)中,所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0089] 在一些示例性实施方案中,制剂可以为稳定的。

[0090] 制剂的稳定性可以包含评估活性药剂的化学稳定性、物理稳定性或功能稳定性。本发明的制剂通常展现出高水平的活性药剂的稳定性。

[0091] 就蛋白质制剂而言,如本文所用,术语“稳定”是指制剂内的蛋白质在本文限定的示例性条件下存储后能够保留可接受程度的化学结构或生物学功能。即使其中所含蛋白质在存储限定时间量之后不能维持其100%的化学结构或生物学功能,所述制剂也可以是稳定的。在某些情况下,在存储限定时间量之后维持蛋白质结构或功能的约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%可视为“稳定”。

[0092] 在一些示例性实施方案中,制剂可以用于治疗、预防和/或改善疾病或病症。可以通过施用本发明的药物制剂治疗和/或预防的示例性非限制性疾病和病症包括:感染;呼吸道疾病;由与神经源性、神经性或伤害性(nociceptic)疼痛相关的任何病况引起的疼痛;遗传病;先天性病症;癌症;疱疹样皮肤病;慢性特发性荨麻疹;硬皮病;增生性瘢痕;惠普尔病(Whipple's Disease);良性前列腺增生;肺部疾病,例如轻度、中度或重度哮喘、过敏反应;川崎病(Kawasaki disease)、镰状细胞病;Churg-Strauss综合征;格雷夫病(Grave's disease);先兆子痫;干燥综合征(Sjogren's syndrome);自身免疫性淋巴增生综合征;自身免疫性溶血性贫血;巴雷特食管(Barrett's esophagus);自身免疫性葡萄膜炎;结核病;肾病;关节炎,包括慢性类风湿性关节炎;炎症性肠病,包括克罗恩氏病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎;全身性红斑狼疮;炎性疾病;HIV感染;AIDS;LDL分离;由于PCSK9激活突变(功能获得性突变,“GOF”)引起的病症、由于杂合性家族性高胆固醇血症(heFH)引起的病症;原发性高胆固醇血症;血脂异常;胆汁淤积性肝病;肾病综合征;甲状腺功能减退症;肥胖症;动脉粥样硬化;心血管疾病;神经退行性疾病;新生儿发作型多系统炎症病症(NOM ID/CINCA);Muckle-Wells综合征(MWS);家族性寒冷型自身炎症综合征(FCAS);家族性地中

海热 (FMF) ; 肿瘤坏死因子受体相关周期性发热综合征 (TRAPS) ; 全身型幼年特发性关节炎 (斯蒂尔病 (Still's Disease)) ; 1型和2型糖尿病; 自身免疫疾病; 运动神经元疾病; 眼病; 性传播疾病; 结核病; 通过VEGF拮抗剂改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过PD-1抑制剂改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过白介素抗体改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过NGF抗体改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过PCSK9抗体改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过ANGPTL抗体改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过活化素抗体改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过GDF抗体改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过Fe1 d 1抗体改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过CD抗体改善、抑制或减轻的疾病或病况; 通过C5抗体改善、抑制或减轻的疾病或病况; 或它们的组合。

[0093] 在一些示例性实施方案中, 制剂可以施用于患者。可以通过任何途径施药。非限制性施药途径包括口服、局部或肠胃外。通过某些肠胃外途径施药可能涉及通过由无菌注射器或例如连续输注系统的一些其它机械装置推动的针头或导管将本发明的制剂引入患者体内。本发明提供的制剂可以使用注射器、注入器、泵或本领域公认的用于肠胃外施药的任何其它装置施用。本发明的制剂也可以呈气雾剂形式施用以在肺或鼻腔中吸收。还可以施用制剂以供通过粘膜吸收, 例如口含施药。

[0094] 在一些示例性实施方案中, 人血清白蛋白可以防止脂肪酸颗粒的形成。在一些示例性实施方案中, 人血清白蛋白可以使预形成的脂肪酸颗粒溶解。如本文所用, “人血清白蛋白”或“HSA”可以包括在肝脏中合成的单体蛋白。其可以是血清的主要大分子成分, 浓度高达50g/L, 并且在血管内和血管外空间之间不断流动 (Angelica M. Merlot, Danuta S. Kalinowski 和 Des R. Richardson, Unraveling the mysteries of serum *albumin* “more than just a serum protein”, 5FRONTIERS IN PHYSIOLOGY (2014))。在各种生物学活动中, HSA可以将包括脂肪酸的低溶解度分子运输到全身 (Maja Thim Larsen 等人, Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease, 4MOLECULAR AND CELLULAR THERAPIES (2016))。HSA可以含有九个不同的脂肪酸结合位点: 三个高亲和力位点、一个中等亲和力位点和五个低亲和力位点 (Eileen S. Krenzel, Zhongjing Chen 和 James A. Hamilton, Correction to Correspondence of Fatty Acid and Drug Binding Sites on Human Serum Albumin: A Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Stud, 52BIOCHEMISTRY 2382-2382 (2013))。

[0095] 在一些示例性实施方案中, 制剂可以进一步包含聚山梨酯。

[0096] 如本文所用, “聚山梨酯”是指用于制剂开发以保护抗体免受例如搅拌、冻融过程和气/水界面的各种物理应力影响的常见赋形剂 (Emily Ha, Wei Wang 和 Y. John Wang, Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability, 91JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2252-2264 (2002); Bruce A. Kerwin, Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways, 97JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2924-2935 (2008); Hanns-Christian Mahler 等人, Adsorption Behavior of a Surfactant and a Monoclonal Antibody to Sterilizing-Grade Filters, 99 Journal of Pharmaceutical Sciences 2620-2627 (2010))。聚山梨酯可以包括由聚氧乙烯山梨糖醇酐的脂肪酸酯构成的非离子、两亲表面活性剂, 例如聚氧乙烯山梨糖醇酐头基和饱和单月桂酸酯侧链 (聚山梨

酯20;PS20)或不饱和单油酸酯侧链(聚山梨酯80;PS80)。在一些示例性实施方案中,聚山梨酯可以以0.001%至1%(重量/体积)的范围存在于制剂中。聚山梨酯也可以含有各种脂肪酸链的混合物;例如,聚山梨酯80含有油酸、软脂酸、肉豆蔻酸和硬脂酸脂肪酸,其中单油酸酯部分约占多分散性混合物的58%(Nitin Dixit等人,Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles,105JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016))。聚山梨酯的非限制性实例包括聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯65和聚山梨酯80。

[0097] 聚山梨酯可能易以pH和温度依赖性方式自氧化,另外,暴露于UV光也会产生不稳定性(Ravuri S.k.Kishore等人,Degradation of Polysorbates 20and 80:Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis,100JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 721-731 (2011)),从而在溶液中产生游离脂肪酸与山梨聚糖头基。由聚山梨酯产生的游离脂肪酸可以包括具有六个至二十个碳的任何脂肪族脂肪酸。游离脂肪酸的非限制性实例包括油酸、软脂酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸或它们的组合。

[0098] 在一些示例性实施方案中,脂肪酸颗粒的大小可以为至少5 $\mu\text{m}$ 。此外,这些脂肪酸颗粒可以根据其大小分类为可见颗粒(>100 $\mu\text{m}$ )、显微镜可见颗粒(<100 $\mu\text{m}$ ,其可以细分为微米颗粒(1-100 $\mu\text{m}$ )和亚微米颗粒(100nm-1000nm))和纳米颗粒(<100nm)(Linda Narhi、Jeremy Schmit和Deepak Sharma,Classification of protein aggregates,101JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 493-498)。

[0099] 在一些示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以是可见颗粒。可见颗粒可以通过目测确定。

[0100] 在一些示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以是显微镜可见颗粒。根据美国药典(USP),显微镜可见颗粒可以通过光阻法来监测。

[0101] 在一些示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以由聚山梨酯形成。在一些特定示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以在脂肪酶的存在下由聚山梨酯形成。如本文所用,“脂肪酶”是指能够催化脂肪水解的酶。脂肪酶可以在动物到植物再到微生物的几乎所有生命形式中找到。哺乳动物脂肪酶超家族可以包含7个不同的类别,所述类别通过位置和底物特异性进行区分。CHO-K1 mRNA的分析发现了137种脂肪酶和磷脂酶,包括变体(Benjamin G.Kremkow等人,CHOgenome.org 2.0:Genome resources and website updates,10BIOTECHNOLOGY JOURNAL 931-938 (2015))。尚未鉴别在纯化生物治疗药物产品中专门负责聚山梨酯降解的脂肪酶,但很可能会发现几种,这表明制造过程和生物治疗剂本身的影响。可以从商业来源获得的哺乳动物、真菌和细菌来源中筛选出几种不同的脂肪酶。

[0102] 在一些示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以通过拉曼光谱法检测。如本文所用,术语“拉曼光谱法”是指基于拉曼散射法的光谱法。拉曼光谱法可以提供拉曼光谱,其可以鉴别指纹区(2000至400 $\text{cm}^{-1}$ )中谱带的存在和位置,从而能够通过拉曼光谱数据库进行比较来化学鉴别所分析的物质(C.V.Raman和K.S.Krishnan,A New Type of Secondary Radiation,121NATURE 501-502 (1928);Zai-Qing Wen,Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals,96JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2861-2878 (2007))。

[0103] 示例性实施方案

[0104] 本文所公开的实施方案提供了用于快速表征样品中的蛋白质的组合物、方法和系统。

[0105] 如本文所用,术语“包括(include、includes和including)”意味着是非限制性的,并且应均理解为意指“包含(comprise、comprises和comprising)”。

[0106] 在一些示例性实施方案中,本公开提供一种防止或减少制剂中的脂肪酸颗粒形成的方法,所述方法包括向制剂中添加有效量的人血清白蛋白。

[0107] 在一些示例性实施方案中,本公开提供一种使制剂中的脂肪酸颗粒溶解的方法,所述方法包括向制剂中添加有效量的人血清白蛋白。

[0108] 在一些示例性实施方案中,本公开提供一种包含(i)活性药剂和(ii)人血清白蛋白的制剂。

[0109] 在一些特定示例性实施方案中,活性药物成分可以是小分子。在一些其它特定示例性实施方案中,活性药物成分可以是蛋白质。在一些示例性实施方案中,活性药物成分可以是治疗性蛋白。

[0110] 在一些示例性实施方案中,制剂可以包含抗体。在一些特定示例性实施方案中,制剂可以包含选自由以下组成的群组的抗体:单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段、双特异性抗体、多特异性抗体或它们的组合。

[0111] 在一些示例性实施方案中,制剂可以包含至少一种活性药剂。在一些特定示例性实施方案中,制剂可以包含两种活性药剂。

[0112] 在一些示例性实施方案中,制剂可用于治疗疾病或病症。

[0113] 在一些示例性实施方案中,制剂可用于预防疾病或病症。

[0114] 在一些示例性实施方案中,制剂可以施用于患者。

[0115] 在一些特定示例性实施方案中,制剂可以口服地施用于患者。

[0116] 在一些示例性实施方案中,制剂可以通过肠胃外途径施用于患者。在一些特定实施方案中,制剂可以通过静脉内途径施用于患者。在一些特定实施方案中,制剂可以通过皮下途径施用于患者。在一些特定实施方案中,制剂可以通过肌肉内途径施用于患者。

[0117] 在一些示例性实施方案中,制剂可以是液体制剂。在一些示例性实施方案中,制剂中的活性药剂的量可以在约0.01mg/mL至约600mg/mL的范围内。在一些特定实施方案中,制剂中的活性药剂的量可以是约0.01mg/mL、约0.02mg/mL、约0.03mg/mL、约0.04mg/mL、约0.05mg/mL、约0.06mg/mL、约0.07mg/mL、约0.08mg/mL、约0.09mg/mL、约0.1mg/mL、约0.2mg/mL、约0.3mg/mL、约0.4mg/mL、约0.5mg/mL、约0.6mg/mL、约0.7mg/mL、约0.8mg/mL、约0.9mg/mL、约1mg/mL、约2mg/mL、约3mg/mL、约4mg/mL、约5mg/mL、约6mg/mL、约7mg/mL、约8mg/mL、约9mg/mL、约10mg/mL、约15mg/mL、约20mg/mL、约25mg/mL、约30mg/mL、约35mg/mL、约40mg/mL、约45mg/mL、约50mg/mL、约55mg/mL、约60mg/mL、约65mg/mL、约70mg/mL、约80mg/mL、约85mg/mL、约90mg/mL、约100mg/mL、约110mg/mL、约120mg/mL、约130mg/mL、约140mg/mL、约150mg/mL、约160mg/mL、约170mg/mL、约180mg/mL、约190mg/mL、约200mg/mL、约225mg/mL、约250mg/mL、约275mg/mL、约300mg/mL、约325mg/mL、约350mg/mL、约375mg/mL、约400mg/mL、约425mg/mL、约450mg/mL、约475mg/mL、约500mg/mL、约525mg/mL、约550mg/mL、约575mg/mL或约600mg/mL。

[0118] 在一些示例性实施方案中,制剂可能能够形成脂肪酸颗粒。在一些特定示例性实

实施方案中,脂肪酸颗粒可以包含游离脂肪酸。在一些其它特定示例性实施方案中,游离脂肪酸分子与人血清白蛋白分子的比为约6:1至约1:1。在一些特定示例性实施方案中,游离脂肪酸分子与人血清白蛋白分子的比为约0.5:1、约0.6:1、约0.7:1、约0.8:2、约0.9:1、约1:1、约2:1、约2:1、约4:1、约5:1、约6:1、约7:1、约8:1、约9:1或约10:1。在一些特定示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以包含油酸。

[0119] 在一些特定示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以包含饱和直链脂肪酸。在一些其它特定示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以包含具有最多二十个碳原子的饱和直链脂肪酸。在一些其它特定示例性实施方案中,游离脂肪酸可包括至少一种选自以下的脂肪酸:乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一酸、十二酸、十三酸、十四酸、十五酸、十六酸、十七酸、十八酸、十九酸、二十酸或它们的组合。

[0120] 在一些特定示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以包含不饱和直链脂肪酸。在一些特定示例性实施方案中,脂肪酸颗粒可以包含具有最多二十个碳原子的不饱和直链脂肪酸。在一些示例性实施方案中,游离脂肪酸颗粒可以包括十八碳四烯酸、反亚油酸、棕榈油酸、异油酸、二十烯酸、反油酸、二十碳烯酸(gondoic acid)、油酸、软脂酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸、花生酸、棕榈油酸、亚油酸、花生四烯酸和它们的组合。

[0121] 在一些示例性实施方案中,制剂中的人血清白蛋白浓度可以为至少约2.5mg/mL。在一些特定示例性实施方案中,制剂中的人血清白蛋白的浓度可以为至少约2.5mg/mL、至少约2.6mg/mL、至少约2.7mg/mL、至少约2.8mg/mL、至少约2.9mg/mL、至少约3.0mg/mL、至少约3.1mg/mL、至少约3.2mg/mL、至少约3.3mg/mL、至少约3.4mg/mL、在至少约3.5mg/mL、3.6mg/mL、至少约3.7mg/mL、至少约3.8mg/mL、至少约3.9mg/mL、至少约4.0mg/mL、至少约4.1mg/mL、至少约4.2mg/mL、至少约4.3mg/mL、至少约4.4mg/mL、至少约4.5mg/mL、4.6mg/mL、至少约4.7mg/mL、至少约4.8mg/mL、至少约4.9mg/mL、至少约5.0mg/mL、至少约5.1mg/mL、至少约5.2mg/mL、至少约5.3mg/mL、至少约5.4mg/mL、至少约5.5mg/mL、5.6mg/mL、至少约5.7mg/mL、至少约5.8mg/mL、至少约5.9mg/mL、至少约6.0mg/mL、至少约6.1mg/mL、至少约6.2mg/mL、至少约6.3mg/mL、至少约6.4mg/mL、至少约6.5mg/mL、6.6mg/mL、至少约6.7mg/mL、至少约6.8mg/mL、至少约6.9mg/mL、至少约7.0mg/mL、至少约7.1mg/mL、至少约7.2mg/mL、至少约7.3mg/mL、至少约7.4mg/mL或至少约7.5mg/mL。

[0122] 在一些示例性实施方案中,制剂中的人血清白蛋白可以减少制剂中的脂肪酸颗粒的形成。

[0123] 在一些示例性实施方案中,制剂中的人血清白蛋白可以使制剂中的脂肪酸颗粒溶解。

[0124] 在一些示例性实施方案中,制剂中的人血清白蛋白可以结合由聚山梨酯降解产生的游离脂肪酸并且使其螯合,从而将溶液中的有效浓度降低至临界胶束浓度以下的水平。

[0125] 在一些示例性实施方案中,制剂中的人血清白蛋白可以充当脂肪酸槽(fatty acid sink)。

[0126] 在一些示例性实施方案中,制剂中的人血清白蛋白可以消除可见/显微镜可见脂肪酸颗粒的出现。

[0127] 在一些示例性实施方案中,与不含人血清白蛋白的制剂相比,制剂中的人血清白蛋白可以延长制剂的保质期。

[0128] 在一些示例性实施方案中,制剂可以进一步包含聚山梨酯。在一些特定实施方案中,聚山梨酯可以选自聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯65、聚山梨酯80和它们的组合。在一些示例性实施方案中,制剂中的聚山梨酯的浓度可以为约0.001%w/v至约1%w/v。在一些特定实施方案中,制剂中的聚山梨酯的浓度可以为约0.001%w/v、约0.002%w/v、约0.003%w/v、约0.004%w/v、约0.005%w/v、约0.006%w/v、约0.007%w/v、约0.008%w/v、约0.009%w/v、约0.01%w/v、约0.011%w/v、约0.012%w/v、约0.013%w/v、约0.014%w/v、约0.015%w/v、约0.016%w/v、约0.017%w/v、约0.018%w/v、约0.019%w/v、约0.02%w/v、约0.021%w/v、约0.022%w/v、约0.023%w/v、约0.024%w/v、约0.025%w/v、约0.026%w/v、约0.027%w/v、约0.028%w/v、约0.029%w/v、约0.03%w/v、约0.031%w/v、约0.032%w/v、约0.033%w/v、约0.034%w/v、约0.035%w/v、约0.036%w/v、约0.037%w/v、约0.038%w/v、约0.039%w/v、约0.04%w/v、约0.041%w/v、约0.042%w/v、约0.043%w/v、约0.044%w/v、约0.045%w/v、约0.046%w/v、约0.047%w/v、约0.048%w/v、约0.049%w/v、约0.05%w/v、约0.051%w/v、约0.052%w/v、约0.053%w/v、约0.054%w/v、约0.055%w/v、约0.056%w/v、约0.057%w/v、约0.058%w/v、约0.059%w/v、约0.06%w/v、约0.061%w/v、约0.062%w/v、约0.063%w/v、约0.064%w/v、约0.065%w/v、约0.066%w/v、约0.067%w/v、约0.068%w/v、约0.069%w/v、约0.07%w/v、约0.071%w/v、约0.072%w/v、约0.073%w/v、约0.074%w/v、约0.075%w/v、约0.076%w/v、约0.077%w/v、约0.078%w/v、约0.079%w/v、约0.08%w/v、约0.081%w/v、约0.082%w/v、约0.083%w/v、约0.084%w/v、约0.085%w/v、约0.086%w/v、约0.087%w/v、约0.088%w/v、约0.089%w/v、约0.09%w/v、约0.091%w/v、约0.092%w/v、约0.093%w/v、约0.094%w/v、约0.095%w/v、约0.096%w/v、约0.097%w/v、约0.098%w/v、约0.099%w/v、约0.1%w/v、约0.11%w/v、约0.12%w/v、约0.13%w/v、约0.14%w/v、约0.15%w/v、约0.16%w/v、约0.17%w/v、约0.18%w/v、约0.19%w/v、约0.2%w/v、约0.21%w/v、约0.22%w/v、约0.23%w/v、约0.24%w/v、约0.25%w/v、约0.26%w/v、约0.27%w/v、约0.28%w/v、约0.29%w/v、约0.3%w/v、约0.31%w/v、约0.4%w/v、约0.41%w/v、约0.42%w/v、约0.43%w/v、约0.44%w/v、约0.45%w/v、约0.46%w/v、约0.47%w/v、约0.48%w/v、约0.49%w/v、约0.5%w/v、约0.51%w/v、约0.52%w/v、约0.53%w/v、约0.54%w/v、约0.55%w/v、约0.56%w/v、约0.57%w/v、约0.58%w/v、约0.59%w/v、约0.6%w/v、约0.61%w/v、约0.62%w/v、约0.63%w/v、约0.64%w/v、约0.65%w/v、约0.66%w/v、约0.67%w/v、约0.68%w/v、约0.69%w/v、约0.7%w/v、约0.71%w/v、约0.72%w/v、约0.73%w/v、约0.74%w/v、约0.75%w/v、约0.76%w/v、约0.77%w/v、约0.78%w/v、约0.79%w/v、约0.8%w/v、约0.81%w/v、约0.82%w/v、约0.83%w/v、约0.84%w/v、约0.85%w/v、约0.86%w/v、约0.87%w/v、约0.88%w/v、约0.89%w/v、约0.9%w/v、约0.91%w/v、约0.92%w/v、约0.93%w/v、约0.94%w/v、约0.95%w/v、约0.96%w/v、约0.97%w/v、约0.98%w/v、约0.99%w/v或约1%w/v。

[0129] 在一些示例性实施方案中,制剂可以进一步包含脂肪酶。

[0130] 在一些示例性实施方案中,制剂可以进一步包含聚山梨酯和脂肪酶,其中脂肪酶可以使聚山梨酯水解以形成脂肪酸颗粒。

[0131] 在整个专利说明书中引用各种出版物,包括专利、专利申请、公布的专利申请、等级号、技术文献和学术文章。这些引用的参考文献中的每一个参考文献通过引用以其整体

并且出于所有目的并入本文。

[0132] 通过参考以下实施例,将更全面地理解本发明。然而,所述实施例不应当被解释为限制本发明的范围。

[0133] 实施例

[0134] 材料和试剂制备.除非另有指示,否则所有反应均在含有25mM Tris pH 7.5、100mM KCl、20mM CaCl<sub>2</sub> (TKC缓冲液)的缓冲水溶液中进行。粘稠色杆菌脂肪酶从EMD Millipore (Billerica, MA) 购买;冻干无脂肪酸人血清白蛋白 (FAF-HSA) 和人血清从Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 购买。超精制聚山梨酯20 (PS20) 和聚山梨酯80 (PS80) 从Croda (Edison, NJ) 获得。对于IgG实验,根据制造商的建议,用150mM NaCl和35mM Tris pH 8.0重构从Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 购买的人冻干多克隆IgG,并且在用25mM Tris、100mM KCl pH 7.5平衡的Zeba自旋脱盐柱(Thermo Fisher Scientific)上脱盐。

[0135] 试剂的纯化.冻干的粘稠色杆菌脂肪酶在大约1mL的TKC反应缓冲液中重构,并且在用相同缓冲液平衡的Superdex increase 20010/300SEC柱上进行纯化。合并纯化的脂肪酶部分,并且使用Nanodrop One C分光光度计在UV<sub>λ=280nm</sub>下使用0.95的消光系数确定蛋白质浓度(4.2mg/mL)。等分试样存储在-20°C下的10% (v/v) 甘油中。使用Nanodrop One C在UV<sub>λ=280nm</sub>下使用0.531的消光系数确定FAF-HSA浓度。

[0136] 通过浊度测量进行的颗粒检测.使用基于板的分析来通过监测随时间(通常2至4小时)变化的450nm处的吸光度来检测颗粒的存在。所述分析基于光散射的基本原理(浊度评估)检测大于约20nm的颗粒。将纯化的脂肪酶添加到含有0.1%聚山梨酯80的TKC缓冲液中,最终浓度范围为0.4至5μg/mL。在保持在25°C下的Spectra Max 340酶标仪上在间歇振荡的情况下以5分钟的间隔测量吸光度。在不添加脂肪酶的情况下,通过测量0.1%聚山梨酯80的吸光度来确定基线值。使用SoftMax Pro软件(版本6.5)进行仪器控制、数据采集和分析。

[0137] 从来自商业来源的哺乳动物、真菌和细菌来源中筛选几种不同的脂肪酶。细菌脂肪酶的选择主要基于快速聚山梨酯的水解和随后的颗粒形成,这为鉴别控制颗粒形成的条件提供了明显的优势,这在生物治疗药物产品环境中可能需要数月至数年。此外,细菌脂肪酶适用于更广泛的溶液条件,这会强烈影响颗粒形成。特定来说,必需存在有助于中和酸性头基的静电排斥的钾。

[0138] 实施例1.在颗粒形成中粘稠色杆菌脂肪酶对聚山梨酯80的水解。

[0139] 由于脂肪酶的水解,可能会在含有PS80的溶液中形成颗粒(Nitin Dixit等人, Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016))。

[0140] 颗粒形成是一个多步骤的过程:首先,脂肪酶催化PS80在脂肪酸酯键处水解,以释放山梨糖醇环和脂肪酸链;其次,多种游离脂肪酸聚集形成颗粒。为了测试粘稠色杆菌脂肪酶的活性,将0.1%PS80与0.4至5μg/mL的不同浓度的脂肪酶一起培育,并且在数小时内监测450nm处的吸光度。

[0141] 为了检测溶液中颗粒的存在,用吸光光谱法监测样品浊度。在25°C下培育样品,并且采集120分钟过程中450nm处的吸光度。使用了0到1μg之间的不同浓度的脂肪酶。将不含

有脂肪酶的样品用作对照。

[0142] 450nm处的信号增加指示溶液浊度增加,这归因于颗粒形成。图1显示增加脂肪酶浓度导致最终浊度升高且观察剂量依赖性反应的初始增加所需的时间减少。此外,不含有脂肪酶的样品用作对照(空心三角形),浊度不随时间增加,并且提供基线吸光度水平。

[0143] 实施例2.形成的颗粒组成的鉴别

[0144] 2.1颗粒的制备.

[0145] 通过在室温下将2.5 $\mu$ g/mL脂肪酶与PS80在TKC缓冲液中培育3小时,然后离心来制备颗粒。弃去上清液,将沉淀物用缓冲液洗涤一次,并且通过超声波降解重构。为了在IgG的存在下产生颗粒,添加人多克隆IgG直至最终浓度为7.5mg/mL。将机械分散的沉淀物沉积在5 $\mu$ m聚碳酸酯膜过滤器(RapID; Monmouth Junction, NJ)上。使用具有785nm单色激光的RapID Single Particle Explorer在50x物镜下以100%强度/10秒曝光时间对颗粒进行拉曼光谱法,以产生针对样品的光谱。

[0146] 2.2拉曼光谱法.

[0147] 采用拉曼光谱法来鉴别培育脂肪酶与PS80之后的颗粒成分。此方法使用非弹性光散射来产生每个分子特有的能谱,然后将所述能谱与含有各种化学结构指纹的参考库进行比较。200个颗粒中156个颗粒的拉曼光谱经鉴别与油酸的光谱高度类似(图2)。如图2中可见的黑色轨迹是内部参考油酸。1650 $\text{cm}^{-1}$ 处的峰与线性烃链中的C=C键的数量成正比,并且因此为不饱和油酸烃链的一个特征。其它鉴别到的物质包括月桂酸和软脂酸,这两种也是聚山梨酯的降解产物。

[0148] 实施例3.通过HSA防止颗粒形成.

[0149] HSA含有数个对脂肪酸具有高亲和力和低亲和力的结合位点,并且因此具有充当脂肪酸槽的潜力,从而可以抑制聚山梨酯水解时的颗粒形成。为了测试HSA在防止颗粒形成方面的有效性,在存在增大浓度的FAF-HSA的情况下,将0.1%PS80与0.5 $\mu$ g脂肪酶在25 $^{\circ}$ C下进行培育,并且通过测量450nm处的吸光度来监测溶液浊度六小时。

[0150] 图3显示在各种FAF-HSA浓度下,在450nm处的吸光度随时间变化的曲线图。不含FAF-HSA的样品(空心菱形)提供了吸光度的上限(约0.4nm)。如图3中可见,HSA对颗粒出现的影响为剂量依赖性反应,其中误差线表示两次重复的标准误差。对照样品不含FAF-HSA,并且显示6小时后的最终吸光度为约0.40D。FAF-HSA的添加使得最终吸光度降低(较低浊度)以及以浓度依赖性方式出现混浊的时间延迟。值得注意的是,在这段时间内,含有7.5mg/mL FAF-HSA的样品没有显示出任何明显的吸光度。用PS20代替PS80,获得类似的结果(数据未显示)。

[0151] 实施例4.脂肪酸结合位点的部分饱和妨碍HSA减轻颗粒形成.

[0152] 为了进一步限定HSA抑制颗粒形成的分子机制,对含有HSA的溶液中的浊度变化进行测量,所述溶液以三个高亲和力结合位点与硬脂酸以化学计量比进行预培育。虽然油酸将是一个更直接比较,但单不饱和脂肪酸的溶解度使得难以最小化游离脂肪酸到样品的转移;因此,硬脂酸作为一种具有同等数量碳氢化合物的饱和分子,被选为可比较的替代物。

[0153] 通过将含70mM纯硬脂酸(Sigma)的乙醇以3:1摩尔比添加到FAF-HSA中,在室温下在25 $^{\circ}$ C下培育30到60分钟,接着以22,000rcf离心4分钟以沉淀未结合的硬脂酸,然后添加

0.5mg脂肪酶和0.1%PS80来制备负载硬脂酸的HSA (SA-HSA),并且监测450nm处的吸光度六小时。

[0154] 图4中的图描绘了在各种SA-HSA浓度下,在450nm处的吸光度随时间的变化,并且不含SA-HSA的样品(空心圆)提供吸光度上限(约0.5),而误差线表示三次重复的标准误差。

[0155] 尽管FAF-HSA在7.5mg/mL下展现出剂量依赖性浊度降低和完全抑制,但在含有SA-HSA的所有样品中检测到浊度增加,这指示颗粒形成未受到抑制(图4)。另外,与含有等量FAF-HSA的样品相比,出现混浊所需的时间更短(图3)。

[0156] 实施例5.减轻不含HSA的抗体制剂中的颗粒形成

[0157] 颗粒形成的减轻似乎与添加到聚山梨酯/脂肪酶混合物中的HSA浓度成正比;然而,任何蛋白质都可非特异性地防止颗粒形成的可能性仍然存在。为了确定这种效应是HSA特有的还是可能是任何蛋白质物种的一般特性,用人多克隆IgG,即第二丰富的循环血清蛋白(N. Leigh Anderson和Norman G. Anderson, *The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects*, *1 MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS* 845-867 (2002) 取代HSA,并且监测溶液随时间推移的浊度。

[0158] 对于IgG实验,根据制造商的建议,用150mM NaCl和35mM Tris pH 8.0重构从Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 购买的人多克隆IgG,并且在用25mM Tris、100mM KCl和pH 7.5平衡的Zeba自旋脱盐柱(Thermo Fisher Scientific)上脱盐。

[0159] 为了测试脂肪酸颗粒减轻对于HSA的特异性,在25°C下将不同浓度的人多克隆IgG添加到含有0.5μg脂肪酶和0.1%PS80的溶液中,并且监测450nm处的吸光度六小时。

[0160] 使用含有脂肪酶和PS80但不含IgG的阳性对照样品(图5,空心菱形)来提供吸光度上限(约0.5)。使用含有PS80和10mg/mL IgG但不含脂肪酶的样品(红色三角形)来提供阴性对照,其显示450nm处的基线吸光度。

[0161] 与针对含有FAF-HSA的样品观察到的浊度降低相反,含有poly-IgG的所有样品都迅速显示吸光度增加,指示其未防止颗粒形成(图5)。令人惊讶的是,与不含IgG的阳性对照相比,浊度的表观水平显示出适度的poly-IgG浓度依赖性增加;然而,难以确定吸光度增加是由颗粒数量增加还是平均粒径增加引起的。在阴性对照中未观察到聚集(图5,红色三角形)。

[0162] 浊度的增加可能归因于蛋白质冻干。为了确定浊度的增加是否由处理蛋白质的方式(即冻干)引起,以两种方式制备溶液态mAb;一种是由未经纯化溶液状态改性,而另一种是模拟制造商用于聚IgG制备的冻干处理。根据多克隆IgG制造商的说明,将单克隆抗体冻干并且重构来进行重复处理,然后在25°C下添加到含有0.5μg脂肪酶和0.1%PS80的溶液中,并且监测450nm处的吸光度六小时。图6中的图A显示未冻干的单克隆抗体。图6中的图B显示冻干的相同单克隆抗体。所述图描绘在各种单克隆IgG浓度下,在450nm处的吸光度随时间的变化。含有脂肪酶和PS80但不含IgG的阳性对照样品(空心菱形)提供吸光度上限(约0.55)。含有PS80和10mg/mL IgG但不含脂肪酶的阴性对照样品(红色三角形)显示450nm处的基线吸光度。冻干材料显示出与poly-IgG的上升相似的上升,这表明此上升可能是由于冻干处理。

[0163] 实施例6.含HSA的抗体制剂在体外对颗粒形成的减轻

[0164] 为了评估HSA是否可以在多克隆IgG存在的情况下减轻颗粒形成,使用增加浓度的

多克隆IgG进行分析,并且使用HSA、多克隆IgG、脂肪酶和PS80进行测试。

[0165] 在25°C下将4.5mg/mL FAF-HSA和7.5mg/mL FAF-HSA添加到含有多克隆IgG、0.5μg脂肪酶和0.1%PS80的样品中,并且监测450nm处的吸光度六小时。

[0166] 图7描绘在将4.5mg/mL FAF-HSA和7.5mg/mL FAF-HSA添加到各种多克隆IgG浓度时,450nm处的吸光度随时间变化的图。含有脂肪酶和PS80但不含IgG的阳性对照样品(空心菱形)提供吸光度上限(约0.5),并且误差线表示两次重复的标准误差。

[0167] HSA的颗粒抑制活性与不存在多克隆IgG的情况下(图3)观察到的颗粒抑制活性类似,这表明即使在存在另一种血清蛋白的情况下,HSA也抑制颗粒的形成。

[0168] 实施例7.含HSA的抗体制剂在体内对颗粒形成的减轻

[0169] 上述快速脂肪酶介导颗粒形成和检测分析表明,HSA可以在体外防止颗粒形成。作为针对更相关体内环境的第一步,评估HSA是否可以使现存颗粒溶解。

[0170] 为了测试HSA溶解溶液中预形成颗粒的能力,制备颗粒(参见Materials and Methods)并且稀释以获得约0.50D的最大吸光度。将预形成的颗粒与FAF-HSA一起培育,并且监测450nm处的吸光度六小时,如图8所示(展示的数据显示2.5小时的吸光度)。含有脂肪酶和PS80但不含HSA的阳性对照样品(图8,闭合三角形)提供吸光度上限(约0.5)。含有PS80和7.5mg/mL HSA但不含脂肪酶的阴性对照样品(图8,红色三角形)显示450nm处的基线吸光度,并且误差线表示三次重复的标准误差。

[0171] 在向含有升高含量的脂肪酸颗粒的溶液中添加FAF-HSA后,溶液浊度迅速降低;然而,并非所有浓度的FAF-HSA都能达到基线水平(图8)。在小于或等于3.5mg/mL的HSA浓度下观察到的稳定期指示预形成的颗粒没有完全溶解。在浊度分析限制范围内,完全破坏预形成的颗粒需要高于5.5mg/mL的HSA浓度。

[0172] 实施例8.含HSA的抗体制剂在体内对颗粒形成的减轻

[0173] 另外用更接近生理条件的人血清进行与实施例7类似的实验。特定来说,血清中存在的白蛋白与许多不同的低溶解度化合物结合

[0174] 将预形成的颗粒与正常人血清一起培育,并且监测450nm处的吸光度六小时,如图9所示(显示2.5小时的数据,因为没有观察到进一步的变化)。含有脂肪酶和PS80但不含血清的阳性对照样品(空心三角形)提供吸光度上限(约0.6)。包括含有PS80和21%人血清但不含脂肪酶的阴性对照样品(数据未显示),并且获得0.250D的吸光度,并且误差线表示三次重复的标准误差。由于人血清的基线吸光度,另外在不含脂肪酶、PS80或颗粒的情况下分析每一浓度的血清,并且图9中显示的结果描绘了背景减除信号。

[0175] 虽然含有血清的所有样品都展现出浊度降低,但只有那些含有至少14%血清的样品才能在1.5小时内获得指示基本上没有颗粒的基线。假设人血清中白蛋白的上限为50mg/mL,这相当于大约7.5mg/mL的白蛋白,与获得零浊度基线所需的FAF-HSA的量一致。

[0176] 因此,发现人血清白蛋白在生物制药行业中的一种新颖的潜在有益用途。HSA可以减轻脂肪酸颗粒形成,这指示HSA作为赋形剂的加入可能有助于延长某些含有聚山梨酯的药物产品的保质期。重要的是,HSA还可以溶解溶液中现存的颗粒,这表明生理浓度的HSA可以在施用药物产品后有效地消除存在的颗粒。

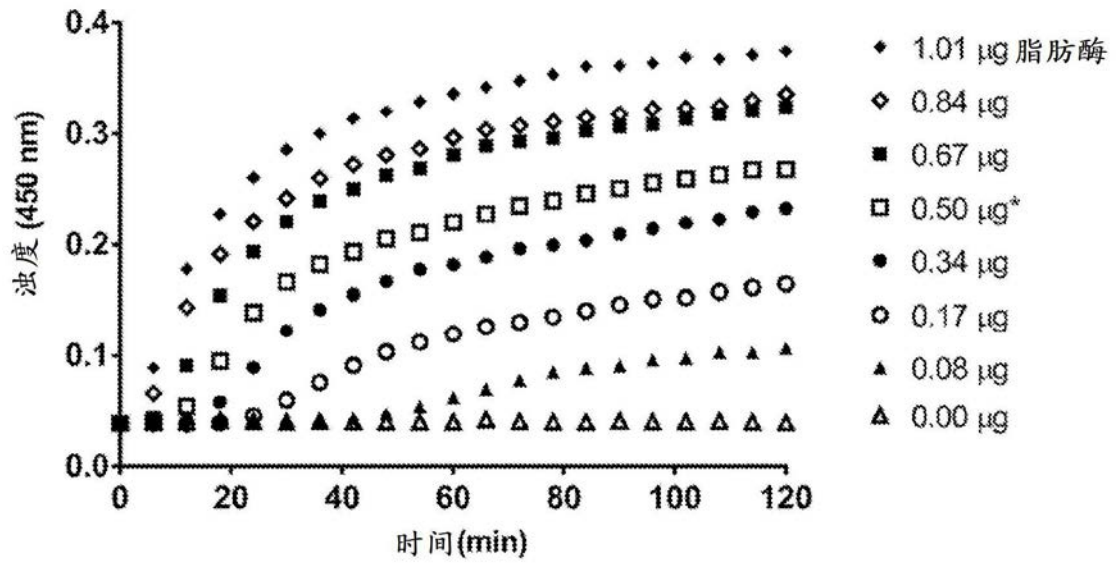


图1

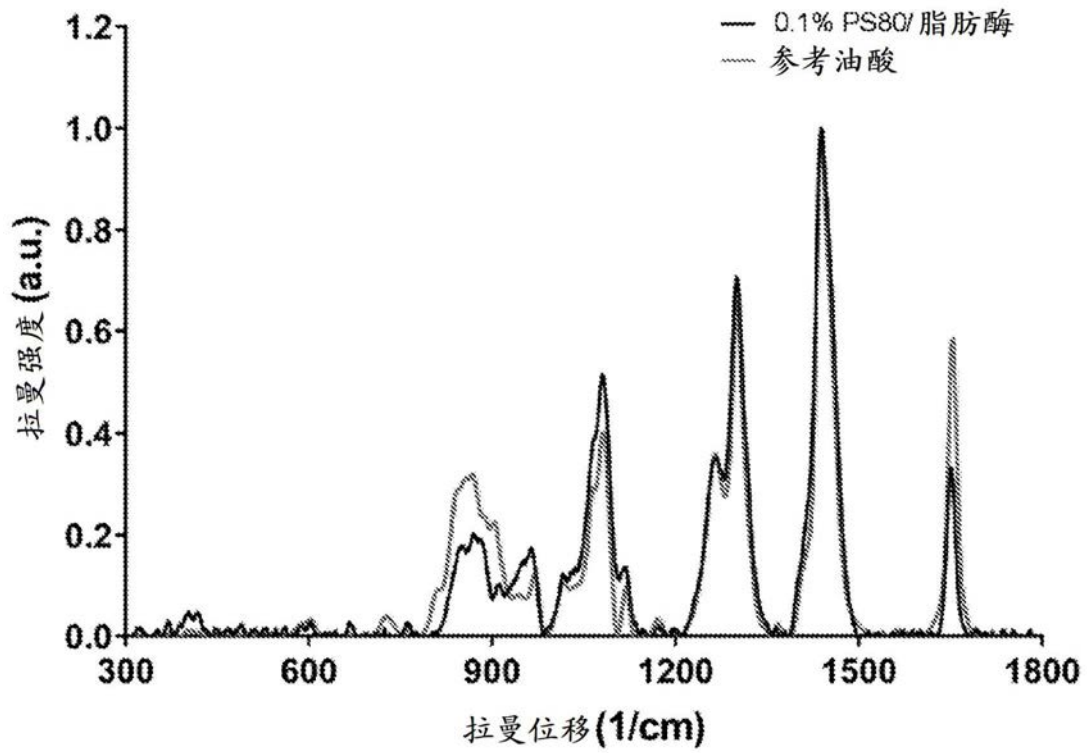


图2

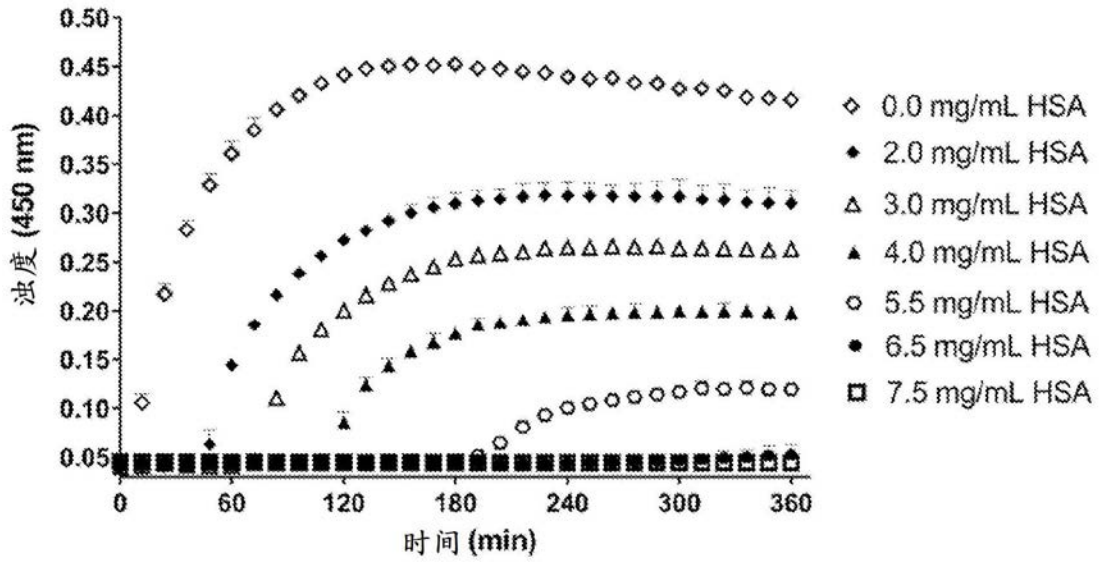


图3

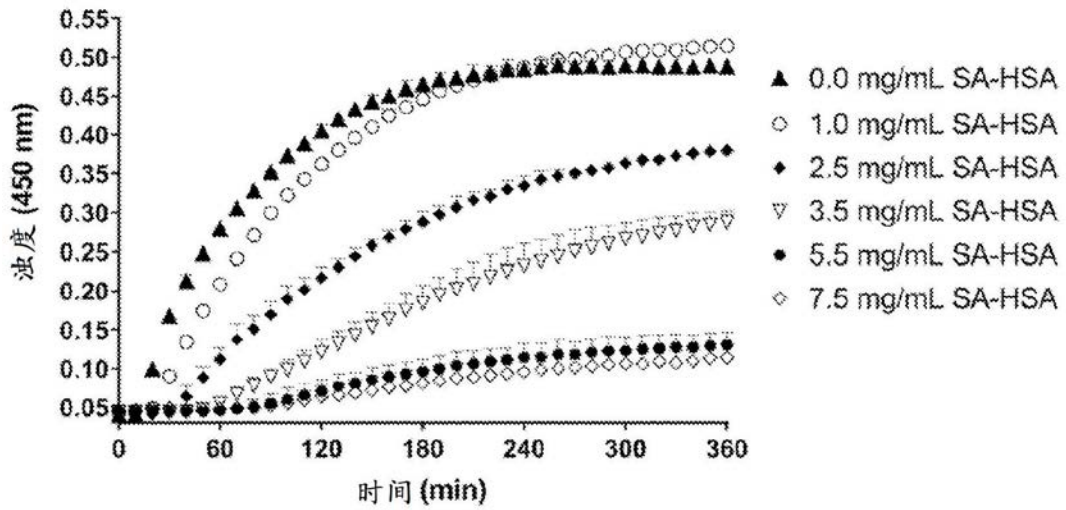


图4

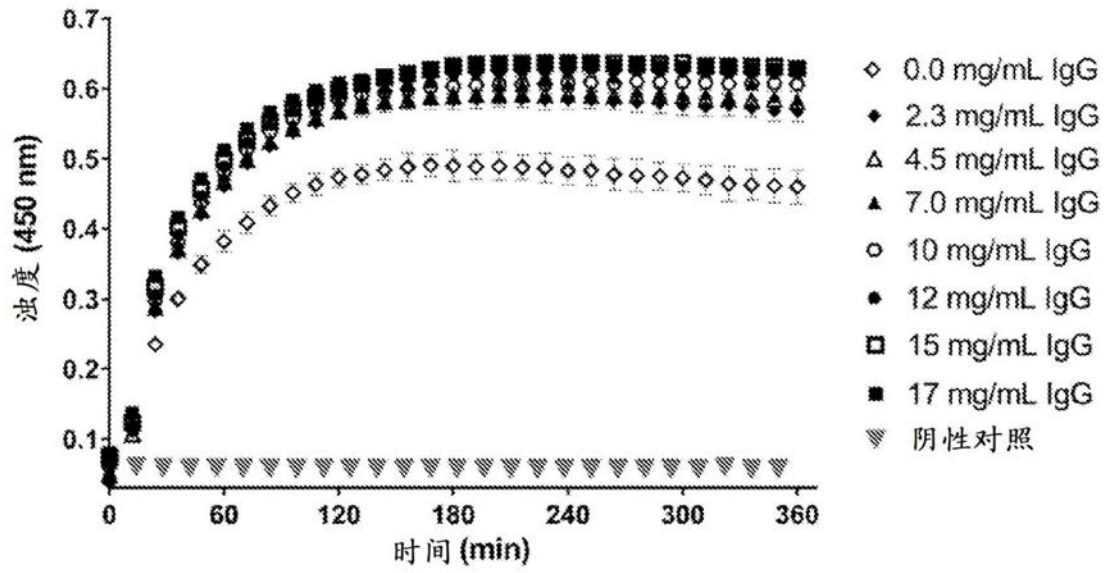


图5

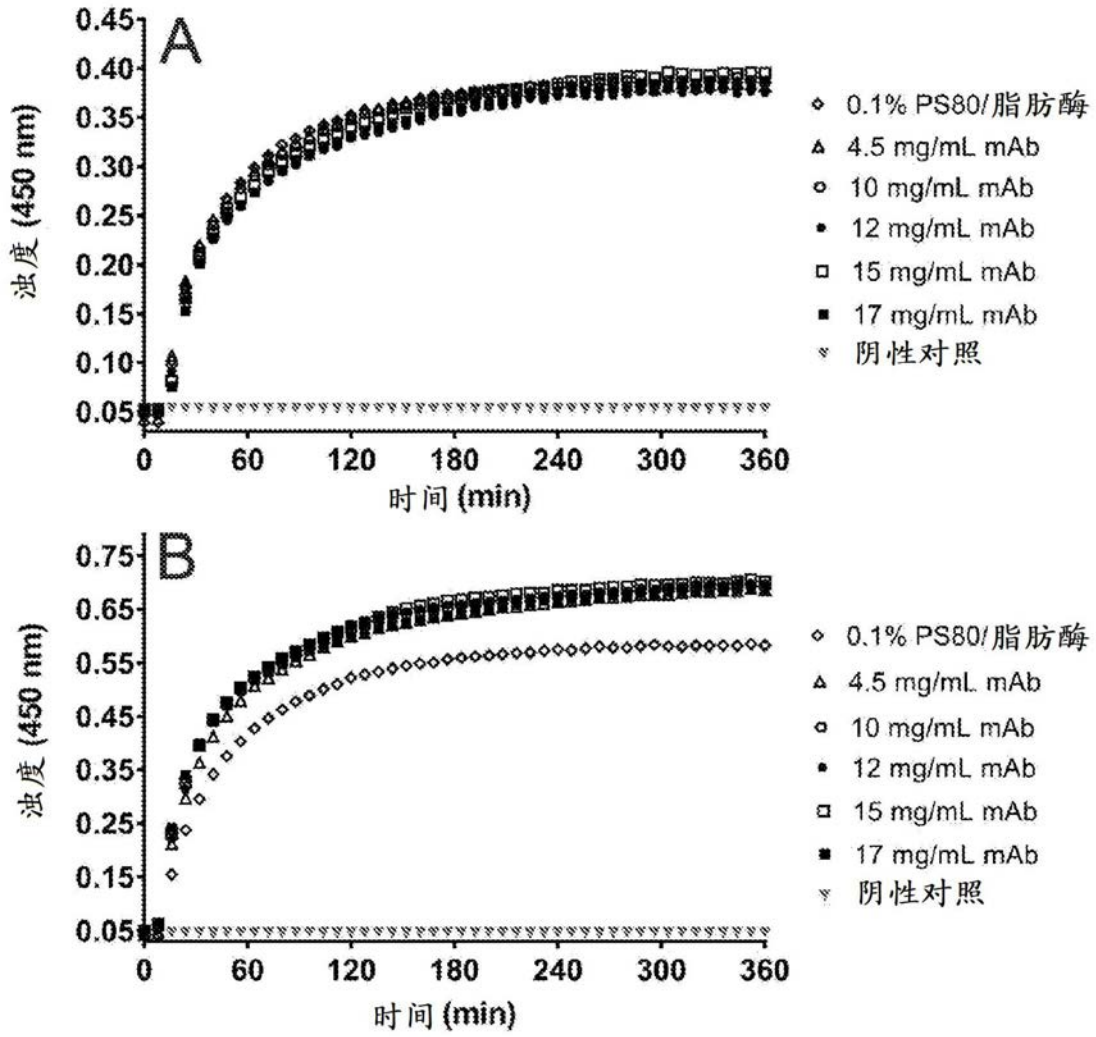


图6

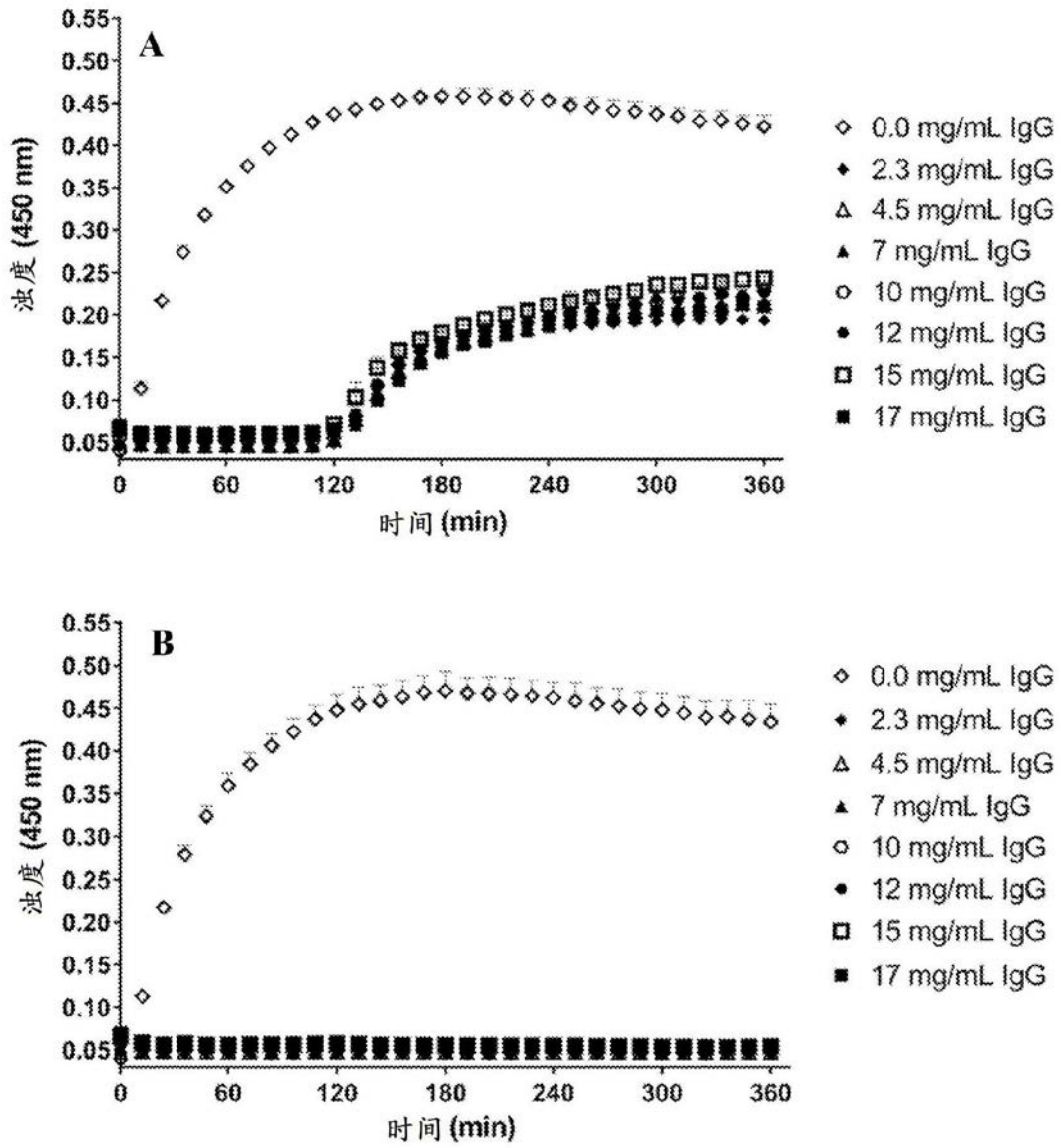


图7

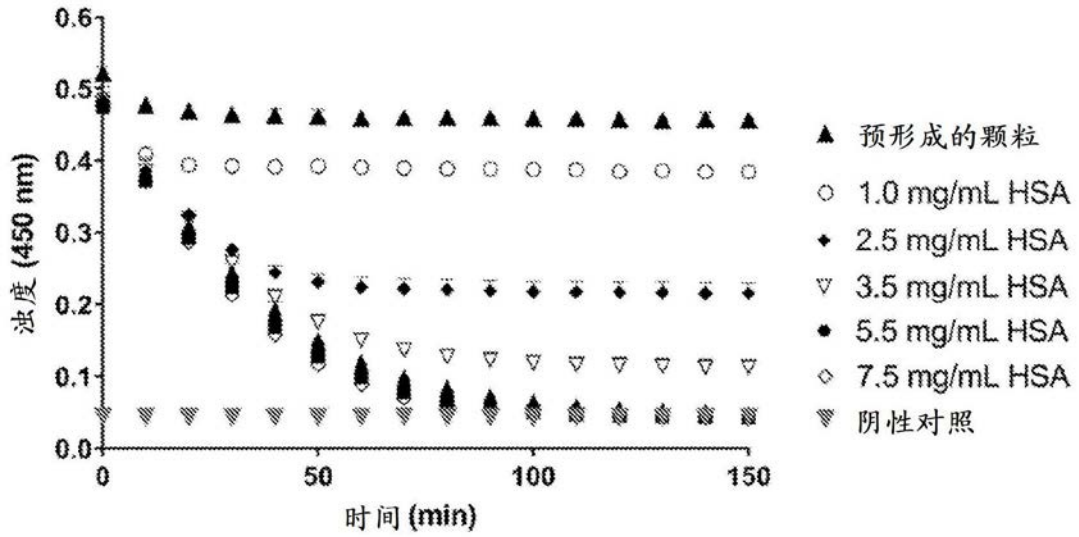


图8

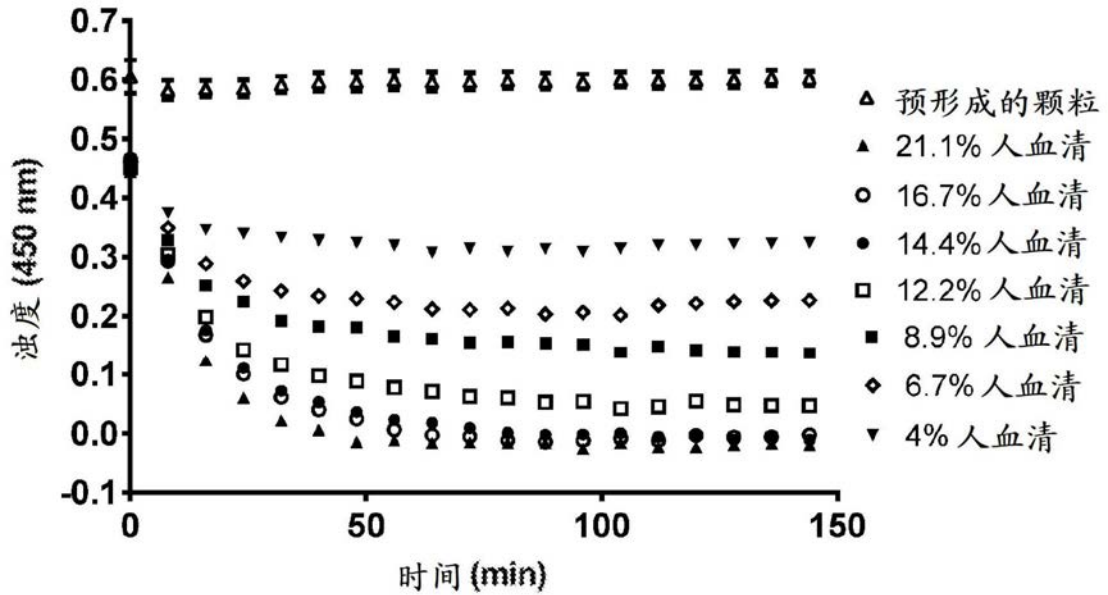


图9