(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102892430 A
(43)申请公布日 2013.01.23

(21)申请号 201180023857.X
(22)申请日 2011.03.16
(30)优先权数据
61/314,984 2010.03.17 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.11.13
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2011/028659 2011.03.16
(87)PCT申请的公布数据
WO2011/116090 EN 2011.09.22
(71)申请人 雅培研究有限公司
地址 荷兰兹沃勒
(72)发明人 W.弗劳恩霍菲尔 R.查里 V.库马 R.谢德勒 M.西德勒 W.B.施泰恩 C.韦伯
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李连涛 权陆军
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/22(2006.01)

权利要求书 5 页 说明书 64 页
序列表 22 页 附图 1 页

(54)发明名称

抗神经生长因子(NGF)抗体组合物

(57)摘要

本发明涉及抗NGF抗体及其抗原结合片段的稳定组合物,及其在预防和/或治疗其中NGF活性是有害的多种疾病和病症例如疼痛病症中的用途。

CN 102892430 A

1. 一种药物组合物，其包含：

(a) 抗神经生长因子(NGF)抗体或其抗原结合片段；

(b) 约 5 - 约 60 mM 浓度的组氨酸缓冲液；和

(c) 约 0.01% - 约 0.1% 浓度的聚山梨醇酯 80；

其中所述组合物的 pH 是约 5.0 - 约 6.0。

2. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述组合物包含约 10 - 约 30 mM 组氨酸。

3. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 pH 是约 5.5。

4. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述组合物包含约 0.01 % - 约 0.02% 聚山梨醇酯 80。

5. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述组合物进一步包含约 1 - 约 100 mg/mL 的多元醇。

6. 权利要求 5 的药物组合物，其中所述多元醇选自山梨糖醇和甘露醇。

7. 权利要求 6 的药物组合物，其中所述多元醇是甘露醇。

8. 权利要求 7 的药物组合物，其中所述组合物包含约 10 - 约 30 mg/mL 甘露醇。

9. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述组合物进一步包含约 10 - 约 100 mg/mL 的糖。

10. 权利要求 9 的药物组合物，其中所述糖是蔗糖。

11. 权利要求 10 的药物组合物，其中所述组合物包含约 10 - 约 70 mg/mL 蔗糖。

12. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述组合物不包含多元醇或糖。

13. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述组合物不包含甲硫氨酸。

14. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分的浓度是约 1 - 约 240 mg/mL。

15. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分的浓度是约 20 - 约 120 mg/mL。

16. 权利要求 1-11 和 13-15 中任一项的药物组合物，其中(a)抗 NGF 抗体或其抗原结合片段与(b)多元醇、糖或其组合的摩尔比大于 1:1400。

17. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述组合物包含：

(a) 约 20 mg/mL 的所述抗体或其抗原结合部分；

(b) 约 15 mM 组氨酸；和

(c) 约 0.01% 聚山梨醇酯 80；

其中所述制剂的 pH 是约 5.5。

18. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述组合物包含：

(a) 约 60 mg/mL 的所述抗体或其抗原结合部分；

(b) 约 30 mM 组氨酸；和

(c) 约 0.02% 聚山梨醇酯 80；

其中所述制剂的 pH 是约 5.5。

19. 权利要求 1 的药物组合物，其适合于冻干。

20. 一种冻干的药物组合物，其包含：

(a) 约 1 - 约 120 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段；

(b) 约 1 - 约 10 mg 的组氨酸；和

(c)约 0.1 - 约 0.4 mg 的聚山梨醇酯 80。

21. 权利要求 20 的冻干的药物组合物,其中所述组合物包含 :

(a)约 60 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段 ;

(b)约 4.7 mg 的组氨酸 ;和

(c)约 0.2 mg 的聚山梨醇酯 80。

22. 权利要求 20 的冻干的药物组合物,其中所述组合物包含 :

(a)约 20 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段 ;

(b)约 2.3 mg 的组氨酸 ;和

(c)约 0.1 mg 的 聚山梨醇酯 80。

23. 权利要求 20 - 22 中任一项的冻干的药物组合物,其进一步包含约 1 - 约 100 mg 的多元醇。

24. 权利要求 23 的冻干的药物组合物,其中所述多元醇是约 10 - 约 50 mg 甘露醇。

25. 权利要求 20 - 24 中任一项的冻干的药物组合物,其进一步包含约 1 - 约 100 mg 的糖。

26. 权利要求 25 的冻干的药物组合物,其中所述糖是约 1 - 约 100 mg 蔗糖。

27. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述抗 NGF 抗体或其抗原结合部分与人 NGF 结合。

28. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述抗 NGF 抗体或其抗原结合部分包含人 IgG4 恒定区。

29. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述抗 NGF 抗体或抗原结合部分包含铰链区突变。

30. 权利要求 29 的药物组合物,其中所述铰链区突变包含在 SEQ ID NO :9 的氨基酸位置 108 处的丝氨酸突变。

31. 权利要求 29 的药物组合物,其中在 SEQ ID NO :9 的氨基酸位置 108 处的所述丝氨酸突变为脯氨酸。

32. 权利要求 29 的药物组合物,其中所述人 IgG4 恒定区包含 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列。

33. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合部分具有下述功能性质中的一种或多种 :

a)与人 NGF 结合,但不与人脑源性神经营养因子(BDNF)、人神经营养蛋白 3 (NT-3)或人神经营养蛋白 4 (NT-4)结合 ;

b)以 100 pM 或更少的 K_D 与人或大鼠 NGF 结合 ;

c)抑制 NGF 与 TrkA 或 $p75^{NTR}$ 的结合 ;

d)抑制 TF-1 细胞的 NGF 依赖性增殖 ;

e)抑制 NGF 依赖性鸡背根神经节存活 ;和

f)抑制 NGF 依赖性 PC12 细胞神经突长出。

34. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中当施用于受试者时,所述抗体或其抗原结合部分不显示出回弹作用。

35. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合部分包括包含

CDRs 1、2 和 3 的重链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs :3、4 和 5 的氨基酸序列。

36. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分包括包含 CDRs 1、2 和 3 的轻链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs :6、7 和 8 的氨基酸序列。

37. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分包括包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的重链可变区。

38. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分包括包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的轻链可变区。

39. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分与这样的抗体竞争结合 NGF，所述抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的轻链可变区。

40. 权利要求 1-26 中任一项的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分包括包含 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列的重链。

41. 权利要求 1-26 和 40 中任一项的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分包括包含 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列的轻链。

42. 一种药物组合物，其包含 :

(a) 抗神经生长因子 (NGF) 抗体或其抗原结合片段，其包括 (i) 包含分别具有 SEQ ID NOs :3、4 和 5 的氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3 的重链可变区，(ii) 包含分别具有 SEQ ID NOs :6、7 和 8 的氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3 的轻链可变区，和 (iii) 具有 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列的人 IgG4 恒定区，其中所述抗体或其抗原结合片段的浓度是约 10 - 约 50 mg/mL ;

(b) 约 10 - 约 30 mM 组氨酸浓度的组氨酸缓冲液 ;和

(c) 约 0.01% - 约 0.02% 浓度的聚山梨醇酯 80 ;

其中所述组合物的 pH 是约 5.0 - 约 6.0。

43. 一种药物组合物，其包含 :

(a) 抗神经生长因子 (NGF) 抗体，其包括 (i) 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的重链可变区，(ii) 具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的轻链可变区，和 (iii) 包含在 SEQ ID NO :9 的位置 108 处的铰链区突变的人 IgG4 恒定区，其中所述抗体或其抗原结合片段的浓度是约 10 - 约 50 mg/mL ;

(b) 约 10 - 约 30 mM 组氨酸浓度的组氨酸缓冲液 ;和

(c) 约 0.01% - 约 0.02% 浓度的聚山梨醇酯 80 ;

其中所述组合物的 pH 是约 5.0 - 约 6.0。

44. 一种药物组合物，其包含 :

(a) 包含人 IgG4 恒定区的抗神经生长因子 (NGF) 抗体，其中所述抗体包含具有 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列的轻链，其中所述抗体或其抗原结合片段的浓度是约 10 - 约 50 mg/mL ;

(b) 约 10 - 约 30 mM 组氨酸浓度的组氨酸缓冲液 ;和

(c) 约 0.01% - 约 0.02% 浓度的聚山梨醇酯 80 ;

其中所述组合物的 pH 是约 5.0 - 约 6.0。

45. 权利要求 42 - 44 中任一项的药物组合物，其进一步包含约 10 - 约 50 mg/mL 甘露醇。

46. 权利要求 42 - 45 中任一项的药物组合物，其进一步包含约 5 - 约 70 mg/mL 蔗糖。

47. 权利要求 42 - 44 中任一项的药物组合物，其基本上由下述组成：

(a) 约 10 - 30 mg/mL 的所述抗体或其抗原结合片段；

(b) 约 15 mM 组氨酸缓冲液；和

(c) 约 0.01% 聚山梨醇酯 80；

其中所述制剂的 pH 是约 5.5。

48. 权利要求 45 的药物组合物，其基本上由下述组成：

(a) 约 10 - 30 mg/mL 的所述抗体或其抗原结合片段；

(b) 约 15 mM 组氨酸缓冲液；

(c) 约 0.01% 聚山梨醇酯 80；和

(d) 约 10 - 30 mg/mL 甘露醇；

其中所述制剂的 pH 是约 5.5。

49. 权利要求 46 的药物组合物，其基本上由下述组成：

(a) 约 10 - 30 mg/mL 的所述抗体或其抗原结合片段；

(b) 约 15 mM 组氨酸缓冲液；

(c) 约 0.01% 聚山梨醇酯 80；和

(d) 约 40 - 70 mg/mL 蔗糖；

其中所述制剂的 pH 是约 5.5。

50. 权利要求 46 的药物组合物，其基本上由下述组成：

(a) 约 10 - 30 mg/mL 的所述抗体或其抗原结合片段；

(b) 约 15 mM 组氨酸缓冲液；

(c) 约 0.01% 聚山梨醇酯 80；

(d) 约 10 - 30 mg/mL 甘露醇；和

(e) 约 5 - 10 mg/mL 蔗糖；

其中所述制剂的 pH 是约 5.5。

51. 权利要求 42 - 50 中任一项的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合片段与多元醇和或糖的比大于 1:1400。

52. 权利要求 42 - 51 中任一项的药物组合物，其中所述药物组合物是冻干的。

53. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分选自单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、CDR 移植抗体、Fab、Fab'、F (ab') 2、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、单结构域抗体、双抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体和双特异性抗体。

54. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述抗体或其抗原结合部分是抗体 PG110。

55. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述制剂以液体形式稳定至少约 3 个月。

56. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述制剂以液体形式稳定至少约 12 个月。

57. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述制剂以冷冻或冻干形式稳定至少 3 个月。

58. 权利要求 57 的药物组合物，其中所述制剂以冷冻或冻干形式稳定至少 6 个月。

59. 权利要求 57 的药物组合物，其中所述制剂以冷冻或冻干形式稳定至少 12 个月。

60. 权利要求 55 或 56 的药物组合物，其中所述制剂贮存于 2-8℃。

61. 权利要求 57 或 58 的药物组合物，其中所述制剂冷冻贮存于 -80℃。

62. 权利要求 57 或 58 的药物组合物，其中所述制剂以冻干形式贮存于 2-8℃。

63. 权利要求 57 或 58 的药物组合物，其中所述制剂以冻干形式贮存于室温。

64. 权利要求 55 - 63 中任一项的药物组合物，其中存在小于约 10% 的抗体聚集。

65. 权利要求 55 - 63 中任一项的药物组合物，其中存在小于约 3% 的抗体聚集。

66. 前述权利要求中任一项的药物组合物，其中所述制剂适合于静脉内、皮下和 / 或肌内施用 .

一种装置，其包含权利要求 1-65 中任一项的药物组合物。

67. 权利要求 66 的装置，其中所述装置选自注射器、笔、植入物、无针注射装置、吸入装置和贴剂。

68. 一种制造物品，其包含权利要求 1-67 中任一项的药物组合物或装置。

69. 权利要求 1-65 中任一项的药物组合物、或权利要求 66-67 中任一项的装置治疗 NGF 介导的疾病或状况的用途。

70. 权利要求 69 的用途，其中所述 NGF 介导的疾病或状况是疼痛。

71. 权利要求 70 的用途，其中所述疼痛选自骨关节炎疼痛、慢性腰背痛、糖尿病性神经性疼痛、癌症疼痛、来自骨转移灶的疼痛、间质性膀胱炎、膀胱疼痛综合征、与慢性非细菌性前列腺炎相关的疼痛、与子宫内膜异位症相关的疼痛、与子宫纤维瘤相关的疼痛和术后疼痛。

72. 权利要求 69-71 中任一项的用途，其中药物组合物适合于在 0.1 mg/kg - 10/mg/kg 范围中的剂量施用所述抗 NGF 抗体或其抗原结合片段。

73. 权利要求 69-72 中任一项的用途，其中所述药物组合物适合于静脉内、皮下或关节内施用。

74. 权利要求 69-74 中任一项的用途，其中所述药物组合物适合于与第二种药物试剂一起施用。

75. 权利要求 74 的用途，其中所述第二种药物试剂选自 NSAIDs、镇痛药包括阿片类镇痛药和非典型镇痛药、局麻药、神经阻滞、酚封闭、治疗抗体、类固醇、抗惊厥药、抗抑郁药、局部辣椒素、抗病毒药、TrkA 抑制剂和 PKC 抑制剂。

抗神经生长因子(NGF)抗体组合物

[0001] 相关申请

本申请要求于2010年3月17日提交的美国临时专利申请号61/314,984的优先权,其内容引入本文作为参考。

[0002] 发明背景

神经生长因子(NGF)是超过50年前作为促进感觉和交感神经元存活和分化的分子发现的分泌性蛋白质。NGF的β链仅负责NGF的神经生长刺激活性。β链同源二聚化并且掺入更大的蛋白质复合物内。NGF是称为神经营养蛋白的神经营养因子的家族成员。NGF以高亲和力与称为TrkA的原肌球蛋白受体激酶结合。NGF也能够结合称为$p75^{NTR}$的受体,肿瘤坏死因子受体超家族的成员,其还与其他神经营养蛋白相互作用。NGF的结构和功能在例如Sofroniew,M.V.等人(2001)*Annu. Rev. Neurosci.* 24:1217-1281;Weismann,C.和de Vos,A.M.(2001)*Cell. Mol. Life Sci.* 58:748-759;Fahnestock,M.(1991)*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 165:1-26中综述。

[0003] 尽管NGF最初因其促进神经元存活和分化的能力而鉴定,但存在这些发育效应仅是NGF生物学的一个方面的越来越多的证据。特别地,NGF已牵涉持续或慢性疼痛的传播和维持。例如,NGF的局部和全身施用已显示引发痛觉过敏和异常性疼痛(Lewin,G.R.等人(1994)*Eur. J. Neurosci.* 6:1903-1912)。NGF在人中的静脉内输注产生全身肌痛,而局部施用诱发除了全身效应外的注射部位痛觉过敏和异常性疼痛(Apfel,S.C.等人(1998)*Neurology*51:695-702)。此外,在特定形式的癌症中,过量NGF促进神经纤维的生长和浸润,伴随癌症疼痛的诱导(Zhu,Z.等人(1999)*J. Clin. Oncol.* 17:241-228)。

[0004] NGF在慢性疼痛中的牵涉已导致基于抑制NGF效应的治疗方法中相当大的兴趣(参见例如Saragovi,H.U.和Gehring,K.(2000)*Trends Pharmacol. Sci.* 21:93-98)。例如,可溶形式的TrkA受体用于阻断NGF的活性,其显示显著减少神经瘤的形成,负责神经性疼痛,而不损害损伤神经元的细胞体(Kryger,G.S.等人(2001)*J. Hand Surg.*(Am.)26:635-644)。

[0005] 中和NGF活性的另一种方法是抗NGF抗体的使用,所述抗体的例子已得到描述(参见例如,PCT公开号WO 2001/78698、WO 2001/64247、WO 2002/096458、WO 2004/032870、WO 2005/061540、WO 2006/131951、WO 2006/110883、美国专利号7,449,616;美国公开号US 20050074821、US 20080033157、US 20080182978和US 20090041717)。在神经性疼痛的动物模型中(例如神经干或脊神经结扎),针对NGF的中和抗体的全身注射预防异常性疼痛和痛觉过敏(Ramer,M.S.和Bisby,M.A.(1999)*Eur. J. Neurosci.* 11:837-846;Ro,L.S.等人(1999)*Pain*79:265-274)。此外,用中和性抗NGF抗体的治疗产生鼠癌症疼痛模型中的显著疼痛减少(Sevcik,M.A.等人(2005)*Pain*115:128-141)。

[0006] 含有抗NGF抗体(例如PG110)的较早制剂已具有在制剂中的抗体的物理不稳定性的缺点,如通过严重可见的粒子形成和沉淀现象反映的。因此,本领域需要含有抗NGF抗体的制剂,其维持物理稳定性且减少粒子形成敏感性。

[0007] 发明概述

本发明至少部分基于含有抗 NGF 抗体(例如人源化 PG110 抗体)的新制剂的开发,所述制剂是物理上稳定的,并且不具有粒子形成敏感性的缺点。

[0008] 相应地,本发明提供了包含下述的药物组合物:(a)抗神经生长因子(NGF)抗体或其抗原结合片段,(b)以约 5 - 约 60 mM 浓度的组氨酸缓冲液;和(c)以约 0.01% - 约 0.1% 浓度的聚山梨醇酯 80;其中组合物的 pH 是约 5.0 - 约 6.0。在特定实施方案中,该组合物进一步包含糖和/或多元醇,例如本文描述的那些。在其他实施方案中,该组合物不包含多元醇或糖。在另外其他实施方案中,该组合物不包含甲硫氨酸。

[0009] 在特定实施方案中,本发明提供了由下述组成、或基本上由下述组成的药物组合物:(a)抗神经生长因子(NGF)抗体或其抗原结合片段,(b)以约 5 - 约 60 mM 浓度的组氨酸缓冲液;和(c)以约 0.01% - 约 0.1% 浓度的聚山梨醇酯 80;其中组合物的 pH 是约 5.0 - 约 6.0。

[0010] 在特定实施方案中,本发明提供了由下述组成、或基本上由下述组成的药物组合物:(a)抗神经生长因子(NGF)抗体或其抗原结合片段,(b)以约 5 - 约 60 mM 浓度的组氨酸缓冲液;(c)以约 0.01% - 约 0.1% 浓度的聚山梨醇酯 80;和(d)多元醇和/或糖;其中组合物的 pH 是约 5.0 - 约 6.0。

[0011] 在特定实施方案中,本发明提供了由下述组成、或基本上由下述组成的药物组合物:(a)抗神经生长因子(NGF)抗体或其抗原结合片段,(b)以约 5 - 约 60 mM 浓度的组氨酸缓冲液;(c)以约 0.01% - 约 0.1% 浓度的聚山梨醇酯 80;和(d)多元醇;其中组合物的 pH 是约 5.0 - 约 6.0。

[0012] 在特定实施方案中,本发明提供了由下述组成、或基本上由下述组成的药物组合物:(a)抗神经生长因子(NGF)抗体或其抗原结合片段,(b)以约 5 - 约 60 mM 浓度的组氨酸缓冲液;(c)以约 0.01% - 约 0.1% 浓度的聚山梨醇酯 80;和(d)糖;其中组合物的 pH 是约 5.0 - 约 6.0。

[0013] 在特定实施方案中,本发明的药物组合物是液体药物组合物。在其他实施方案中,药物组合物适合于冻干。相应地,本发明进一步提供了包含下述的冻干药物组合物:(a)约 1 - 约 240 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段,(b)约 1 - 约 10 mg 的组氨酸;和(c)约 0.1 - 约 0.4 mg 的聚山梨醇酯 80。在特定实施方案中,冻干组合物进一步包含糖和/或多元醇。在其他实施方案中,冻干组合物不包含多元醇或糖。

[0014] 在特定实施方案中,本发明提供了由下述组成、或基本上由下述组成的药物组合物:(a)约 1 - 约 240 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段,(b)约 1 - 约 10 mg 的组氨酸;和(c)约 0.1 - 约 0.4 mg 的聚山梨醇酯 80。

[0015] 在其他实施方案中,本发明提供了由下述组成、或基本上由下述组成的药物组合物:(a)约 1 - 约 240 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段,(b)约 1 - 约 10 mg 的组氨酸;(c)约 0.1 - 约 0.4 mg 的聚山梨醇酯 80;和(d)约 1 - 约 100 mg 的多元醇和/或约 1 - 约 100 mg 的糖。

[0016] 在其他实施方案中,本发明提供了由下述组成、或基本上由下述组成的药物组合物:(a)约 1 - 约 240 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段,(b)约 1 - 约 10 mg 的组氨酸;(c)约 0.1 - 约 0.4 mg 的聚山梨醇酯 80;和(d)约 1 - 约 100 mg 的多元醇。

[0017] 在另外其他实施方案中,本发明提供了由下述组成、或基本上由下述组成的药物

组合物：(a)约 1 - 约 240 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段，(b)约 1 - 约 10 mg 的组氨酸；(c)约 0.1 - 约 0.4 mg 的聚山梨醇酯 80；和(d)约 1 - 约 100 mg 的糖。在特定实施方案中，抗 NGF 抗体或其抗原结合部分与人 NGF 结合。在其他实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含人 IgG4 恒定区，其中人 IgG4 恒定区包含铰链区突变。优选地，IgG4 恒定区中的铰链区突变包含在 SEQ ID NO：9（其显示人 IgG4 恒定区的野生型氨基酸序列）的氨基酸位置 108 处的丝氨酸突变。更优选地，在 SEQ ID NO：9 的氨基酸位置 108 处的丝氨酸突变为脯氨酸。在优选实施方案中，抗 NGF 抗体的人 IgG4 恒定区包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列。

[0018] 在本发明的组合物中含有的优选抗 NGF 抗体是抗体 PG110，其重链氨基酸序列显示于 SEQ ID NO：13 中，并且其轻链氨基酸序列显示于 SEQ ID NO：16 中。在另一个实施方案中，本发明提供了包含抗 NGF 抗体的组合物，所述抗 NGF 抗体含有由 SEQ ID NO：11 的核苷酸序列编码的重链和由 SEQ ID NO：14 的核苷酸序列编码的轻链。在另一个实施方案中，抗 NGF 抗体包括包含 SEQ ID NO：1（其显示 PG110 的重链可变区）的氨基酸序列的重链可变区。在另一个实施方案中，抗 NGF 抗体包括包含 SEQ ID NO：2（其显示 PG110 的轻链可变区）的氨基酸序列的轻链可变区。在另外一个实施方案中，抗 NGF 抗体包括包含 SEQ ID NO：1 的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO：2 的氨基酸序列的轻链可变区。在另外一个实施方案中，抗 NGF 抗体与这样的抗体竞争结合 NGF，所述抗体包括包含 SEQ ID NO：1 的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO：2 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0019] 在另一个实施方案中，抗 NGF 抗体包括包含 CDRs 1、2 和 3 的重链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs：3、4 和 5 的氨基酸序列（其中 SEQ ID NOs：3、4 和 5 分别显示 PG110 的重链可变区 CDRs 1、2 和 3）。在另一个实施方案中，抗 NGF 抗体包括包含 CDRs 1、2 和 3 的轻链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs：6、7 和 8 的氨基酸序列（其中 SEQ ID NOs：6、7 和 8 分别显示 PG110 的轻链可变区 CDRs 1、2 和 3）。在另外一个实施方案中，抗 NGF 抗体包括包含 CDRs 1、2 和 3 的重链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs：3、4 和 5 的氨基酸序列，并且包括包含 CDRs 1、2 和 3 的轻链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs：6、7 和 8 的氨基酸序列。

[0020] 在另外一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分具有下述功能性质中的一种或多种：a)与人 NGF 结合，但不与人脑源性神经营养因子（BDNF）、人神经营养蛋白 3（NT-3）或人神经营养蛋白 4（NT-4）结合；b）以 100 pM 或更少的 K_D 与人或大鼠 NGF 结合；c）抑制 NGF 与 TrkA 或 $p75^{NTR}$ 的结合；d）抑制 TF-1 细胞的 NGF 依赖性增殖；e）抑制 NGF 依赖性鸡背根神经节存活；f）抑制 NGF 依赖性 PC12 细胞神经突长出。

[0021] 在另外一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分选自单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、CDR 移植抗体、Fab、Fab'、F（ab'）2、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、单结构域抗体、双抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、双特异性抗体、或其中潜在的 T 细胞表位已消除的抗体。在进一步的实施方案中，抗体或其抗原结合部分是人源化的。

[0022] 在特定优选的实施方案中，本发明提供了含有抗 NGF 抗体的组合物，所述抗 NGF 抗体具有延长的终末清除半衰期和延长的疼痛减轻持续时间的组合有利特征。相应地，本发明还提供了包含人 IgG4 恒定区的抗 NGF 抗体，其中人 IgG4 恒定区包含突变（优选铰链区突变），其中抗体在食蟹猴中具有至少 15 天、更优选至少 21 天的终末消除半衰期，并且其中在

单次剂量的抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约一周到约十二周的持续时间。

[0023] 本发明还涉及通过给人受试者施用本发明的药物组合物，用于抑制患有 NGF 相关疾病或状况的人受试者中的 NGF 活性的方法。在其他实施方案中，如本文描述的，将第二种药物试剂施用于受试者。在特定实施方案中，NGF 相关疾病或状况是疼痛。NGF 相关疾病和状况的非限制性例子包括炎性痛、术后疼痛、神经性疼痛、骨折痛、痛风关节疼痛、疱疹后神经痛、癌症疼痛、骨关节炎或类风湿性关节炎疼痛、坐骨神经痛、与镰状细胞危象相关的疼痛、头痛、痛经、子宫内膜异位症、肌肉骨骼痛、慢性腰背（low back）痛、纤维肌痛、扭伤、内脏痛、卵巢囊肿、前列腺炎、膀胱炎、间质性膀胱炎、切口痛、偏头痛、三叉神经痛、来自烧伤和 / 或伤口的疼痛、与创伤相关的疼痛、与肌肉骨骼疾病相关的疼痛、强直性脊柱炎、关节周病理学、来自骨转移灶的疼痛、来自 HIV 的疼痛、红斑性肢痛病或由胰腺炎或肾结石引起的疼痛。NGF 相关疾病和状况的其他例子包括恶性黑素瘤、Sjogren’s 综合征和哮喘，例如伴随严重气道高反应性的不受控制的哮喘、和顽固性咳嗽（intractable cough）。用于根据本发明的方法治疗的特别优选的疾病和状况包括炎性痛（特别是骨关节炎或类风湿性关节炎疼痛）、肌肉骨骼痛（特别是慢性腰背痛）、神经性疼痛（特别是糖尿病性神经病）、癌症疼痛和来自骨转移灶的疼痛、间质性膀胱炎 / 膀胱疼痛综合征、与慢性非细菌性前列腺炎相关的疼痛、与子宫内膜异位症和 / 或子宫纤维瘤相关的疼痛和术后疼痛。优选地，疼痛选自骨关节炎疼痛、慢性腰背痛、糖尿病性神经性疼痛、癌症疼痛、来自骨转移灶的疼痛、间质性膀胱炎、膀胱疼痛综合征、与慢性非细菌性前列腺炎相关的疼痛、与子宫内膜异位症相关的疼痛、与子宫纤维瘤相关的疼痛和术后疼痛。

[0024] 本发明的药物组合物可以例如静脉内、皮下（例如经由注射笔或皮下植入）、肌内或关节内施用，尽管本文描述了其他合适的施用途径。

[0025] 本文还提供了包含本发明的药物组合物的试剂盒或制品。

[0026] 附图简述

图 1 是制剂 1 和制剂 2 随着时间过去的稳定性的图解比较。

[0027] 发明详述

本发明涉及具有改善稳定性的抗 NGF 抗体或其抗原结合部分的改善组合物（例如药物组合物）。本发明的组合物一般包含抗 NGF 抗体或其抗原结合片段、合适的缓冲液（例如组氨酸缓冲液）、合适的赋形剂（例如聚山梨醇酯 80），且具有约 5.0 - 约 6.0 的 pH。本发明的组合物可以是液体的，适合于冻干的，和 / 或冻干的。

[0028] 为了使本发明可以更容易理解，首先定义特定术语。另外的定义贯穿详述阐述。

[0029] I. 定义

冠词“一（a，an）”在本文中用于指冠词的语法对象中的一个或超过一个（即至少一个）。例如，“一要素”意指一个要素或超过一个要素。

[0030] 术语“药物制剂”指以这种形式的制剂，以便允许一种或多种活性成分的生物学活性是明确有效的，并且不含对于制剂将施用于其的受试者明显有毒的另外组分。

[0031] 术语“药学可接受的载体”是领域公认的，包括适合于施用于哺乳动物例如人的药学可接受的材料、组合物或媒介物。此类载体包括液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料，涉及携带或转运主题试剂从机体的一个器官或部分到机体的另一个器官或部分。每种载体必须在与组合物的其他成分相容的意义上是“可接受的”，并且对于人受试者

不是有害的，或不影响人受试者的安全。

[0032] “缓冲液”指通过其酸 - 碱缀合物组分的作用抵抗 pH 中的变化的缓冲溶液。本发明的缓冲液具有在约 4 - 约 8 范围中的 pH。将控制 pH 在这个范围中的缓冲液的例子包括磷酸盐、乙酸盐(例如乙酸钠)、琥珀酸盐(例如琥珀酸钠)、葡糖酸盐、谷氨酸盐、组氨酸、柠檬酸盐及其他有机酸缓冲液。

[0033] 术语“赋形剂”指可以加入组合物中，以例如通过改变堆积性能(bulk properties)提供所需稠度，改善稳定性和 / 或调整摩尔渗透压浓度的试剂。常用赋形剂的例子包括但不限于糖、多元醇、氨基酸、表面活性剂和聚合物。“药学可接受的赋形剂”(例如媒介物、添加剂) 是可以合理地施用于哺乳动物受试者例如人的那些，以提供有效剂量的所采用的活性成分。

[0034] 如本文使用的，“多元醇”是具有多个羟基的物质，并且包括糖醇和糖酸。特定多元醇具有小于约 600 D (例如在约 120 - 约 400 D 的范围中)的分子量。多元醇的非限制性例子包括果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、山梨糖、松三糖、棉子糖、甘露醇、木糖醇、赤藓醇、苏糖醇、山梨糖醇、甘油、L- 葡糖酸盐及其金属盐。

[0035] “糖”是具有特有甜味的碳水化合物。糖可以分类为单糖、二糖和多糖。“单糖”是简单糖，例如果糖、左旋糖、葡萄糖和右旋糖、或葡萄的糖(grape sugar)。“二糖”包括乳糖或乳的糖(milk sugar)、麦芽糖或麦芽的糖(malt sugar)、结晶二糖、蔗糖和海藻糖(也称为海藻糖(mycose) 或海藻糖(tremalose))。在水解后，二糖分子获得两个单糖分子。“多糖”包括此类物质例如纤维素、糊精、糖原和淀粉。多糖是由简单糖构成的聚合化合物，并且可以水解以获得简单糖。二糖有时与较简单的多糖(通常为由三个或四个简单糖单位构成的那些) 成组，以形成称为“寡糖”的一类碳水化合物。

[0036] “糖”还可以分类为“还原糖”或“非还原糖”。还原糖通过下述事实加以区分：由于其游离或潜在游离的醛或酮基团，它们具有容易还原许多金属盐(例如铜、银、铋、汞和铁的那些) 的碱性溶液的性质。还原糖包括例如麦芽糖、乳糖、纤维二糖、龙胆二糖、蜜二糖和松二糖。非还原糖的非限制性例子包括蔗糖、海藻糖、棉子糖、松三糖、水苏糖和毛蕊花糖。

[0037] 术语“表面活性剂”一般包括保护组合物中的蛋白质不受空气 / 溶液界面诱导的应激和溶液 / 表面诱导的应激的那些试剂。例如，表面活性剂可以保护蛋白质免于聚集。合适的表面活性剂可以包括例如聚山梨醇酯、聚氧乙烯烷基醚例如 Brij 35.RTM. ；或泊洛沙姆例如 Tween 20、Tween 80 或泊洛沙姆 188。优选的去污剂是聚氧乙烯烷基醚例如 Brij 35.RTM.、Cremophor A25、Sympatens ALM/230 ；聚山梨醇酯 /Tweens，例如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80、Mirj，和泊洛沙姆例如泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 407，以及 Tweens 例如 Tween 20 和 Tween 80。

[0038] “稳定”组合物是其中活性成分例如抗体在其中在制造过程期间和 / 或在贮存后基本上保留其物理稳定性和 / 或化学稳定性和 / 或生物学活性的组合物。用于测量蛋白质稳定性的多种分析技术是本领域可获得的，并且在 Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 和 Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 中综述。

[0039] 如果在颜色和 / 或澄清度的目视检查后，或如通过 UV 光散射或通过尺寸排阻层析

测量的，抗体显示基本上无例如聚集、沉淀和 / 或变性的征兆，那么它在药物组合物中“保留其物理稳定性”。聚集是由此个别蛋白质分子或复合物共价或非共价结合以形成聚集体的过程。聚集可以进行至形成可见沉淀物的程度。含有抗 NGF 抗体的药物组合物的物理稳定性可以例如根据溶液中单体蛋白质的百分比进行测定，其中低百分比(例如小于 3%)的降解(例如断裂的) 和 / 或聚集的蛋白质指示组合物是稳定的。

[0040] 如果在给定时间的化学稳定性是这样的，从而使得抗体视为仍保留其如下定义的生物学活性，那么抗体在本发明的药物组合物中“保留其化学稳定性”。化学稳定性可以通过例如检测且定量化学改变形式的抗体进行评估。化学改变可以涉及尺寸修饰(例如裁剪)，其可以使用尺寸排阻层析、SDS-PAGE 和 / 或基质辅助的激光解吸电离 / 飞行时间质谱法(MALDI/TOF MS)进行估计。其他类型的化学改变包括电荷改变(例如由于脱酰胺或氧化而出现)，其可以通过例如离子交换层析进行估计。

[0041] 如果在药物组合物中的抗体就其预期用途而言是生物学活性的，那么抗体在药物组合物中“保留其生物学活性”。例如，如果在药物组合物中抗体的生物学活性是在制备药物组合物时(例如如在抗原结合测定中测定的))显示出的生物学活性的约 30%、约 20% 或约 10% (在测定的误差内) 内，那么生物学活性被保留。在本发明的制剂内含有的抗 NGF 抗体的生物学活性包括但不限于与人 NGF 结合，抑制 NGF 与 TrkA 或 $p75^{NTR}$ 的结合，抑制 TF-1 细胞的 NGF 依赖性增殖，抑制神经元的 NGF 依赖性存活和分化，和抑制 NGF 依赖性疼痛转导。术语“活性”进一步包括活性，例如抗体对于抗原的结合特异性 / 亲和力，例如与 NGF 抗原结合的抗 NGF 抗体。

[0042] 如本文定义的术语“抑制”指在生物学活性中任何统计上显著的减少，包括活性的完全阻断。例如，“抑制”可以指生物学活性中约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100% 的减少。

[0043] 术语“神经生长因子”或“NGF”在本文中可互换使用，并且包括变体、同种型、同系物、直向同源物和旁向同源物。例如，在特定情况，对于人 NGF 特异性的抗体可以与来自除人外的物种的 NGF 交叉反应。在其他实施方案中，对于人 NGF 特异性的抗体可以对于人 NGF 完全特异性，并且可以不显示出物种或其他类型的交叉反应性。术语“人 NGF”指人序列 NGF，例如包含人 NGF-β 链的氨基酸序列，其前体形式具有 Genbank 登记号 NP_002497，由 Genbank 登记号 NM_002506 的核苷酸序列编码。人 NGF-β 链序列可以通过具有例如保守置换或在非保守区中的置换而不同于 Genbank 登记号 NP_002497 的人 NGF-β，其中人 NGF-β 具有与 Genbank 登记号 NP_002497 的人 NGF-β 基本上相同的生物学功能。术语“大鼠 NGF”指大鼠序列 NGF，例如包含大鼠 NGF-β 链的氨基酸序列，其前体形式具有 Genbank 登记号 XP_227525，由 Genbank 登记号 XP_227525 的核苷酸序列编码。术语“小鼠 NGF”指大鼠序列 NGF，例如包含小鼠 NGF-β 链的氨基酸序列，其前体形式具有 Genbank 登记号 NP_038637，由 Genbank 登记号 NM_013609 的核苷酸序列编码。

[0044] 如本文使用的，术语“TrkA 受体”指 NGF 受体，本领域也称为原肌球蛋白激酶受体 A 和神经营养性酪氨酸激酶受体 1 型(NTRK1)。关于人受体的示例性、非限制性序列包括 Genbank 登记号 NP_001012331 (同种型 1)、NP_002520 (同种型 2) 和 NP_001007793 (同种型 3) 的氨基酸序列。

[0045] 如本文使用的，术语“$p75^{NTR}$ 受体”指神经营养蛋白受体，具有约 75 kDa 的分

子量，其结合 NGF 及其他神经营养蛋白，所述受体在例如 Bothwell，M.（1996）*Science* 272:506-507 中描述。关于人 $p75^{NTR}$ 受体的示例性、非限制性序列是 Genbank 登记号 NP_002498 的氨基酸序列，由 Genbank 登记号 NM_002507 的核苷酸序列编码。

[0046] 如本文就抗 NGF 抗体而言使用的，术语“终末消除半衰期”指如在抗体已施用于其的受试者的血清中测量的，一旦抗体的吸收和再分布完成抗体浓度减少一半所需的时间量。当使用一组受试者时，在受试者中的终末消除半衰期的几何平均数可以用作抗体的终末消除半衰期的量度。

[0047] 如本文就抗 NGF 抗体而言使用的，术语“药理学半衰期”指在体内维持药物效应（用于药物效应的 MRT）的平均时间量。它可以计算为第一个时刻基线校正的效应时间曲线（AUMEC）与随着时间过去累积的基线校正的药物效应（效应时间曲线下面积，AUEC）比较的面积比，使用下式：

药理学半衰期 $$= \frac{AUMEC}{AUEC} = \frac{\int E(t)tdt}{\int E(t)dt}$$

当使用一组受试者时，受试者中的药理学半衰期的几何平均数可以用作抗体的药理学半衰期的量度。

[0048] 如本文使用的，术语“抑制”指生物学活性中任何统计上显著的减少，包括活性的完全阻断。例如，“抑制”可以指生物学活性中约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100% 的减少。

[0049] 如本文可互换使用的，术语“抗体”或“免疫球蛋白”包括完整抗体和任何抗原结合片段（即“抗原结合部分”）或其保留与抗原（例如 NGF）特异性结合的能力的单链。在全长抗体中，每条重链包括重链可变区（本文缩写为 HCVR 或 VH）和重链恒定区。重链恒定区包括 3 个结构域——CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包括轻链可变区（本文缩写为 LCVR 或 VL）和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域——CL。VH 和 VL 区可以进一步再分成称为互补性决定区（CDRs）的高变区，由称为构架区（FR）的更保守区域点缀。每个 VH 和 VL 由 3 个 CDRs 和 4 个 FRs 组成，从氨基末端到羧基末端以下述次序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括免疫系统的多种细胞（例如效应细胞）和经典补体系统的第一种组分（Clq）。免疫球蛋白分子可以具有任何类型（例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY）、类别（例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）或亚类。

[0050] 术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”（或简单地“抗体部分”）指抗体的一种或多种片段，其保留与抗原（例如，NGF）特异性结合的能力。此类抗体实施方案还可以是双特异性、双重特异性或多特异性形式；与两种或多种不同抗原特异性结合。术语抗体的“抗原结合部分”内包含的结合片段例子包括（i）Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；（ii）F（ab'）2 片段，包括在铰链区通过二硫桥连接的 2 个 Fab 片段的二价片段；（iii）由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；（iv）由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段，（v）包含单个可变结构域的 dAb 片段（Ward 等人（1989）Nature 341:544-546，Winter 等人，PCT 公开 WO 90/05144 A1）；和（vi）分离的互补决定区（CDR）。此外，尽管 Fv 片段的 2 个结构域 VL 和 VH 由分开基因编码，但它们可以使用重组法通过合成接头进行连

接，所述合成接头使得它们能够制备为单条蛋白质链，其中 VL 和 VH 区配对以形成单价分子（称为单链 Fv （scFv）；参见例如，Bird 等人（1988）Science 242:423-426 和 Huston 等人（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883）。还包含其他形式的单链抗体，例如双抗体。双抗体是二价、双特异性抗体，其中 VH 和 VL 结构域在单条多肽链上表达，但使用太短而不允许相同链上的两个结构域之间配对的接头，由此迫使结构域与另一条链的互补结构域配对，并且产生两个抗原结合位点（参见例如，Holliger 等人（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poljak 等人（1994）Structure 2:1121-1123）。如本领域众所周知的（Kontermann 和 Dubel 编辑，Antibody Engineering（2001）Springer-Verlag. New York，790（ISBN 3-540-41354-5），此类单链抗体也意欲包含在术语抗体的“抗原结合部分”内。

[0051] 如本文使用的，术语“铰链区突变”指免疫球蛋白恒定结构域的铰链区中的突变例如点突变、置换、添加或缺失。

[0052] 如本文使用的，术语“单克隆抗体”指得自基本上同质抗体的群体的抗体，即群体包含的个别抗体是等同的，除了可以以小量存在的可能天然存在的突变。单克隆抗体是高度特异性的，针对单个抗原位点。此外，与一般包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的常规（多克隆）抗体制剂形成对比，每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。单克隆抗体可以使用任何领域公认的技术进行制备，例如如由 Kohler 等人（1975）*Nature*，256:495 描述的杂交瘤方法，如由例如（参见例如，Lonberg 等人（1994）Nature 368（6474）:856-859）描述的转基因动物，重组 DNA 方法（参见例如，美国专利号 4,816,567）或使用噬菌体抗体文库使用例如 Clarkson 等人，*Nature*，352:624-628（1991）和 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*，222:581-597（1991）中所述的技术。单克隆抗体包括嵌合抗体、人抗体和人源化抗体，并且可以天然出现或重组产生。

[0053] 术语“重组抗体”指通过重组方法制备、表达、创造或分离的抗体，例如（a）从对于免疫球蛋白基因（例如人免疫球蛋白基因）是转基因或转染色体的动物（例如小鼠）或由其制备的杂交瘤中分离的抗体，（b）从例如由转染瘤转化以表达抗体的宿主细胞中分离的抗体，（c）使用噬菌体展示从重组、组合抗体文库（例如含有人抗体序列）中分离的抗体，和（d）通过任何其他方法制备、表达、创造或分离的抗体，所述任何其他方法涉及免疫球蛋白基因序列（例如人免疫球蛋白基因）与其他 DNA 序列的剪接。此类重组抗体可以具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。然而，在特定实施方案中，可以对此类重组人抗体实施体外诱变，并且因此重组抗体的 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列是这样的序列，虽然衍生自人种系 V_H 和 V_L 序列且与之相关，但在体内人抗体种系储库内不天然存在。

[0054] 术语“嵌合免疫球蛋白”或抗体指免疫球蛋白或抗体，其可变区衍生自第一个物种，并且其恒定区衍生自第二个物种。嵌合免疫球蛋白或抗体可以例如通过基因工程由属于不同物种的免疫球蛋白基因区段构建。

[0055] 术语“人源化抗体”或“人源化免疫球蛋白”指抗体或免疫球蛋白，其包括至少一条人源化抗体或免疫球蛋白链（即至少一条人源化轻或重链）。术语“人源化免疫球蛋白链”或“人源化抗体链”（即“人源化免疫球蛋白轻链”或“人源化免疫球蛋白重链”）指具有可变区的免疫球蛋白或抗体链（即分别为轻或重链），其包括基本上来自人免疫球蛋白或抗体的可变构架区和基本上来自非人免疫球蛋白或抗体的互补决定区（CDRs）（例如至少一个 CDR，

优选两个 CDRs，更优选三个 CDRs），并且进一步包括恒定区（例如在轻链的情况下，至少一个恒定区或其部分，并且在重链的情况下，优选三个恒定区）。术语“人源化可变区”（例如“人源化轻链可变区”或“人源化重链可变区”）指包括基本上来自人免疫球蛋白或抗体的可变构架区和基本上来自非人免疫球蛋白或抗体的互补决定区（CDRs）的可变区。

[0056] 在一个实施方案中，术语“人源化抗体”是抗体或其变体、衍生物、类似物或片段，其与目的抗原免疫特异性结合，并且包含具有人抗体的基本上氨基酸序列的构架（FR）区和具有非人抗体的基本上氨基酸序列的互补决定区（CDRs）。如本文使用的，在 CDR 的背景中的术语“基本上”指具有与非人抗体 CDR 的氨基酸序列至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 等同的氨基酸序列。人源化抗体包含至少一个、和一般两个可变区（Fab、Fab’、F（ab’）2、FabC、Fv）的基本上全部，其中 CDR 区的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白（即供体抗体）的那些，并且 FR 区的全部或基本上全部是人免疫球蛋白共有序列的那些。在一个实施方案中，人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区（Fc）的至少部分，一般为人免疫球蛋白的那种。在一些实施方案中，人源化抗体含有轻链以及至少重链的可变结构域。抗体还可以包括重链的 CH1、铰链、CH2、CH3 和 CH4 区。在一个实施方案中，人源化抗体仅含有人源化轻链。在另一个实施方案中，人源化抗体仅含有人源化重链。在特定实施方案中，人源化抗体仅含有轻链的人源化可变结构域和 / 或人源化重链。人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别，包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE，和任何同种型，包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。人源化抗体可以包含来自超过一个类别或同种型的序列，并且特定恒定结构域可以使用本领域众所周知的技术加以选择，以最佳化所需效应子功能。

[0057] 术语“表位”包括能够与免疫球蛋白特异性结合的任何 x 决定簇（例如，多肽）。在特定实施方案中，表位决定簇包括分子例如氨基酸、糖侧链、磷酰基、磺酰基的化学活性的表面分组，并且在特定实施方案中，可以具有特定三维结构特征，和 / 或特定电荷特征。表位是由抗体结合的抗原的区域。在特定实施方案中，当抗体优先识别其在蛋白质和 / 或大分子的复杂混合物中的靶抗原时，它被说成特异性结合抗原。

[0058] 如本文使用的，术语“人抗体”预期包括具有可变区的抗体，其中构架和 CDR 区衍生自人种系免疫球蛋白序列，如例如由 Kabat 等人（See Kabat 等人（1991）*Sequences of proteins of Immunological Interest，第五版*，U.S. Department of Health and Human Services，NIH 公开号 91-3242）描述的。此外，如果抗体含有恒定区，那么恒定区还衍生自人种系免疫球蛋白序列。人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如在体外通过随机或位点特异性诱变或在体内通过体细胞突变引入的突变）。然而，如本文使用的，术语“人抗体”不预期包括其中衍生自另一个哺乳动物物种例如小鼠的种系的 CDR 序列已移植到人构架序列上的抗体。

[0059] 如本文使用的，术语“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体（例如与 NGF 特异性结合的分离的抗体基本上不含特异性结合除 NGF 外的抗原的抗体）。此外，分离的抗体一般基本上不含其他细胞材料和 / 或化学制品。

[0060] 如本文使用的，术语“特异性结合”和“选择性结合”意指抗体或其抗原结合部分，显示出对于特定抗原或表位的可估计的亲和力，并且一般不显示出与其他抗原和表位的显著交叉反应性。“可估计”或优选的结合包括以至少 10^6、10^7、10^8、10^9 M^{-1} 或 10^{10} M^{-1} 的亲和力结合。大于 10^7 M^{-1}、优选大于 10^8 M^{-1} 的亲和力是更优选的。本文所示那些中间的值也预

期在本发明的范围内，并且优选的结合亲和力可以指示为亲和力的范围，例如 10^6 – 10^{10} M^{-1}、优选 10^7 – 10^{10} M^{-1}、更优选 10^8 – 10^{10} M^{-1}。“基本上不显示出显著交叉反应性”的抗体是将无法可估计地与不希望有的实体（例如不希望有的蛋白质性实体）结合的抗体。特异性或选择性结合可以根据任何领域公认用于测定此类结合的方法进行测定，包括例如根据 Scatchard 分析和 / 或竞争结合测定。

[0061] 如本文使用的，术语“K_D”意指例如在平衡时的滴定测量中获得的，或通过将解离速率常数（Koff）除以结合速率常数（Kon），特定抗体 - 抗原相互作用的解离平衡常数或抗体对于抗原的亲和力。结合速率常数（Kon）、解离速率常数（Koff）和平衡解离常数（K 用于代表抗体对于抗原的结合亲和力。用于测定结合和解离速率常数的方法是本领域众所周知的。基于荧光的技术提供在平衡时检查生理学缓冲液中的样品的高灵敏度和能力。可以使用其他实验方法和仪器例如 BIAcore® （生物分子相互作用分析）测定（例如可从 BIAcore International AB，a GE Healthcare 公司，Uppsala，瑞典）获得的仪器）。另外，还可以使用可从 Sapidyne Instruments （Boise，Idaho）获得的 KinExA® （动态排除测定）测定。

[0062] 在一个实施方案中，如使用表面等离振子共振测定或细胞结合测定测量的，根据本发明的抗体以约 100 pM 或更少（即或更佳）（例如 90 pM 或约 80 pM 或约 70 pM 或约 60 pM 或约 50 pM 或约 40 pM 或约 30 pM）的亲和力（K_D）结合抗原（例如 NGF）。在优选实施方案中，抗体以在约 25-35 pM 的范围中的亲和力（K_D）结合 NGF。

[0063] 如本文使用的，术语“K_{ass}”、“K_a”和“K_{on}”意指关于抗体结合成抗体 / 抗原复合物的结合速率常数。如由下式所示，这个值指示抗体与其靶抗原的结合速率或在抗体和抗原之间的复合物形成速率：

抗体（"Ab"）+ 抗原（"Ag"）→ Ab-Ag

如本文使用的，术语“K_{diss}”、”K_d”和“Koff”意指关于抗体从抗体 / 抗原复合物中解离的解离速率常数。如由下式所示，这个值指示抗体与其靶抗原或随着时间过去 Ab-Ag 复合物分离成游离抗体和抗原的解离速率：

Ab + Ag ← Ab-Ag

如本文使用的，术语“IC_{50}”指在体外或体内测定中，将应答抑制至其为最大限度抑制应答的 50% 水平的抗体浓度，即在最大限度抑制应答和未处理的应答之间的一半。

[0064] 如本文使用的，术语“治疗”指本文描述的治疗或预防措施。术语“治疗”采用给受试者例如具有 NGF 相关疾病或状况的受试者施用本发明的抗体，以便预防、治愈、延迟疾病或状况，减少疾病或状况的严重度，或改善疾病或状况的一种或多种症状。

[0065] 如本文使用的，术语“NGF 相关疾病或状况”指这样的疾病或状况，其中 NGF 活性涉及疾病或状况的一种或多种症状、或与疾病或状况的一种或多种症状相关、或介导或促进疾病或状况的一种或多种症状。

[0066] 如本文使用的，术语“受试者”包括任何人或非人动物。在特定实施方案中，受试者是人。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，例如非人灵长类动物、绵羊、犬、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0067] 如本文使用的，术语“回弹作用”指在单次或反复施用后的最初有效性时期后，在受试者中出现的 NGF 掩蔽剂例如抗 NGF 抗体的功效减少。例如，用抗 NGF 抗体的治疗可以最初例如由于炎症或神经损害或其他病因学而减轻疼痛，其随后接着为减少的止痛功效的

时期，其中疼痛最终变得大约与治疗前一样强烈或比治疗前更强烈。在另一个例子中，在单次或反复施用后一段时间，例如在施用后一周的时期(例如在施用后第 1-7 天)，抗 NGF 抗体可以在受试者中显示出最初有效性，其随后接着为减少功效的时期，例如在施用后 1-2 周的时期(例如在施用后第 7-14 天)，这个“回弹”时期可以接着为抗 NGF 抗体的功效恢复的时期。例如，在抗 NGF 抗体的单次或反复施用后可以存在止痛的双相性概况，具有减少功效或甚至夸大的痛觉的中间时期。这个回弹作用可以在例如临床疼痛研究、疼痛的实验模型和 / 或抗 NGF 功效的其他模型中评估。这个回弹作用可以与在回弹期过程中例如受试者中增加的疼痛和 / 或增加的不利事件(例如异常知觉，范围从异常性疼痛到感觉迟钝、感觉异常和感觉过敏或减退)相关。尽管不预期受机制限制，但回弹作用可以由改变的 NGF 表达、改变的 TrkA 或 p75 受体表达或发信号或任何其他机制引起，所述任何其他机制导致在功效的最初时期后，在抗 NGF 的单次或反复施用后瞬时减少的功效。

[0068] 本发明的多个方面在下述小节中进一步详细描述。

[0069] II. 本发明的药物组合物

本发明提供了与领域公认的组合物相比较，具有改善的性质的包含抗 NGF 抗体或其抗原结合片段的液体和冻干的药物组合物。本发明的组合物能够例如在制造、贮存和 / 或反复冻 / 融处理步骤或延长暴露于增加的空气 - 液体界面过程中，维持抗 NGF 抗体或其抗原结合片段的可溶性和稳定性(例如不显示显著乳光、聚集或沉淀)。例如，本发明的组合物维持低水平的蛋白质聚集(即，小于 3%)，尽管含有高量(例如 10 - 约 240 mg/mL)的抗体或其抗原结合片段。本发明的组合物还维持在适合于皮下注射的范围内的低粘度，尽管含有高量(例如 10 - 约 240 mg/mL)的抗体。此外，本发明的组合物维持可溶性，维持适合于皮下或静脉注射的低粘度，并且在例如约 pH 5.0 - 约 pH 6.0 的 pH 范围维持稳定性。因此，本发明的抗体组合物克服关于抗体组合物的许多已知挑战，包括稳定性、粘度、浊度和物理降解挑战。

[0070] 相应地，在一个方面，药物组合物包含抗 NGF 抗体或其抗原结合片段、缓冲液和赋形剂，其足以维持以液体和 / 或冻干形式的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段的稳定性。

[0071] 可以在本发明的组合物中使用的抗 NGF 抗体及其抗原结合片段和制备此类抗体及其抗原结合片段的方法在本文中详细描述。组合物中存在的抗体量例如通过考虑到所需施用剂量、体积和模式进行测定。在本发明的特定实施方案中，本发明的组合物例如液体和 / 或冻干组合物(在重构后)包含约 10 - 约 240 mg/mL、约 20 - 约 120 mg/mL、约 40 - 约 240 mg/mL、约 50-150 mg/mL、约 15 - 约 75 mg/ml 或约 10 - 约 20 mg/ml 抗人 NGF 抗体或其抗原结合片段的蛋白质浓度。尽管本发明的优选实施方案是包含高蛋白质浓度的组合物，但还考虑本发明的组合物可以包含约 1 mg/mL - 约 240 mg/mL、约 1 mg/ml - 约 150 mg/ml 或约 50 mg/mL - 约 150 mg/mL、约 30 mg/mL - 约 50 mg/mL 的抗体浓度。在本发明的一个实施方案中，抗体的浓度是约 100 mg/mL。在本发明的一个实施方案中，抗体的浓度是约 60 mg/mL。在本发明的一个实施方案中，抗体的浓度是约 30 mg/mL。在另一个实施方案中，抗体的浓度是约 20 mg/mL。在另一个实施方案中，抗体的浓度是约 10 mg/mL。在本发明的另一个实施方案中，组合物包含约 55 mg/mL 的抗体浓度。

[0072] 例如对于上述范围中间的范围例如 75-90 mg/ml 也预期是本发明的部分。例如，预期包括使用任何上述值的组合作为上和 / 或下限的值范围。此外，对于上述量和浓度中

间的抗 NGF 抗体浓度也预期是本发明的部分(例如约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239 或约 240 mg/mL)。

[0073] 在本发明的一些实施方案中,组合物例如冻干组合物包含约 1-100 mg、1-75 mg、1-55 mg、1-30 mg、1-20 mg、1-10 mg、10-20 mg、15-75 mg、100-150 mg、110-150 mg、100-140 mg、110-140 mg、120-140 mg、130-140 mg 的抗 NGF 抗体。在其他实施方案中,组合物例如冻干组合物包含约 40-240、40-200、40-180、40-160、40-140、40-120 mg、45-100 mg、50-80 mg 或 55-70 mg 的抗体。在一个实施方案中,组合物例如冻干组合物包含 10 mg 的抗体。在另一个实施方案中,组合物例如冻干组合物包含 20 mg 的抗体。

[0074] 例如对于上述范围中间的范围例如 132-138 或 55-65 也预期是本发明的部分。例如,预期包括使用任何上述值的组合作为上和 / 或下限的值范围。此外,对于上述量和浓度中间的抗 NGF 抗体量和浓度也预期是本发明的部分(例如约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、134.1、134.2、134.3、134.4、134.5、134.6、134.7、134.8、134.9、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149 或 约 150 mg 的抗体)。

[0075] 在本发明的药物组合物中使用的缓冲液是适合于将组合物的 pH 维持在约 4.0 - 约 8.0、约 5.0 - 约 7.0、约 5.0 - 约 6.5、约 5.5 - 约 7.0 范围中的那些。优选地,缓冲液将本发明的药物组合物的 pH 维持在约 5.0 - 约 6.0、约 6.0 - 约 7.0、约 5.5 - 约 6.0、约 6.0 - 约 6.5、约 5.75 - 约 6.25 和约 5.25 - 约 5.75 的范围中。在一个实施方案中,本发明的组合物的 pH 是约 6.0。在一个实施方案中,本发明的组合物的 pH 是约 5.5。在一个实施方案中,本发明的组合物的 pH 是约 5.0。对于上述 pHs 中间的范围和值也预期是本发明的部分(例如 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3 或 6.4 的 pH)。预期包括使用任何上述值的组合作为上和 / 或下限的值范围。

[0076] 将 pH 控制在约 5.5 - 约 7.0 的范围内的缓冲液的例子包括磷酸盐、乙酸盐(例如乙酸钠)、琥珀酸盐(例如琥珀酸钠)、精氨酸、葡糖酸盐、谷氨酸盐、组氨酸、柠檬酸盐及其他

有机酸缓冲液。

[0077] 在一个实施方案中，缓冲液是组氨酸。在本发明的特定实施方案中，组合物中的组氨酸浓度是约 1-100 mM、约 1-30 mM、约 5-30 mM、约 10-30 mM、约 30-60 mM、约 30-40 mM、约 10-50 mM、约 15-60 mM、约 15-45 mM、约 15-30 mM、约 15-25 或约 15-20 mM。在一个实施方案中，组合物中的组氨酸浓度是约 20 mM。在另一个实施方案中，组合物中的组氨酸浓度是约 15 mM。在另一个实施方案中，组合物中的组氨酸浓度是约 30 mM。对于上述浓度中间的组氨酸浓度和范围也预期是本发明的部分(例如约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 或约 100 mM 的组氨酸)。预期包括使用任何上述值的组合作为上和 / 或下限的浓度范围。

[0078] 在本发明的其他实施方案中，组合物例如冻干组合物包含约 1-10 mg 的组氨酸，或约 2-5 mg 组氨酸。在一个实施方案中，组合物包含约 6 mg，例如约 5.7 mg 的组氨酸。在一个实施方案中，组合物包含约 5 mg，例如约 4.7 mg 的组氨酸。在一个实施方案中，组合物包含约 2-3 mg 的组氨酸。对于上述量中间的组氨酸量和范围也预期是本发明的部分(例如 约 1、1.5、2、2.2、2.3、2.5、3、3.5、4、4.5 5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.5、7、7.5 8、8.5、9、9.5 或约 10 mg 的组氨酸)。预期包括使用任何上述值的组合作为上和 / 或下限的量范围。

[0079] 去污剂或表面活性剂也可以加入本发明的抗体组合物中作为赋形剂。示例性去污剂包括非离子型去污剂例如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯 20、80 等)或泊洛沙姆(例如泊洛沙姆 188)。加入的去污剂的量是这样的，从而使得它减少配制的抗体的聚集和 / 或使组合物中的颗粒形成降到最低和 / 或减少吸附。合适的表面活性剂可以包括例如聚山梨醇酯、聚氧乙烯烷基醚例如 Brij 35.RTM. ;或泊洛沙姆例如 Tween 20、Tween 80 或泊洛沙姆 188。优选的去污剂是聚氧乙烯烷基醚例如 Brij 35.RTM.、Cremophor A25、Sympatens ALM/230 ;聚山梨醇酯 /Tweens，例如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80、Mirj，和泊洛沙姆例如泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 407，以及 Tweens 例如 Tween 20 和 Tween 80。

[0080] 在本发明的一个优选实施方案中，组合物包括其为聚山梨醇酯的表面活性剂。在本发明的另一个优选实施方案中，组合物含有去污剂聚山梨醇酯 80。在一个实施方案中，组合物含有约 0.01 - 约 2.0 mg/mL、约 0.01 - 约 1 mg/mL、约 0.05 - 约 2.0 mg/mL、约 0.05 - 约 1.0 mg/mL、约 0.05 - 约 0.5 mg/mL、约 0.05 - 约 0.1 mg/mL 的聚山梨醇酯 80。在一个实施方案中，组合物包含约 1 mg/mL 的聚山梨醇酯 80。在另一个实施方案中，组合物包含约 0.1 mg/mL 的聚山梨醇酯 80。在另外一个实施方案中，组合物包含约 0.05 mg/mL 的聚山梨醇酯 80。在一个实施方案中，组合物包含约 0.001% - 约 0.1%、约 0.005% - 约 0.08%、约 0.007% - 约 0.06%、约 0.01% - 约 0.04%、约 0.01% - 约 0.03% 或约 0.01% - 0.02% 聚山梨醇酯 80。在一个实施方案中，组合物包含约 0.01% 聚山梨醇酯 80。在一个实施方案中，组合物包含约 0.02% 聚山梨醇酯 80。然而，在本发明的其他实施方案中，组合物基本上不含或不含表面活性剂，例如 Tween 或聚山梨醇酯。

[0081] 在本发明的特定实施方案中，组合物例如冻干组合物可以包含约 0.01 - 0.5 mg，

例如约 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45 或约 0.5 mg 的表面活性剂。在一个实施方案中，组合物例如冻干组合物包含约 0.20 mg 的表面活性剂例如聚山梨醇酯 80。在一个实施方案中，组合物例如冻干组合物包含约 0.10 mg 的表面活性剂例如聚山梨醇酯 80。对于上述浓度中间的范围和量也预期是本发明的部分，例如 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9 和 2.0 mg/mL 的表面活性剂。此外，预期包括使用任何上述值的组合作为上和 / 或下限的值范围，例如 0.04 - 1.8 mg/mL 的表面活性剂。

[0082] 本发明的组合物还可以包含多元醇。在本发明的组合物中有用的多元醇包括但不限于海藻糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、山梨糖、松三糖、棉子糖、甘露醇、木糖醇、赤藓醇、苏糖醇、山梨糖醇、甘油、L- 葡糖酸盐及其金属盐中的一种或多种。

[0083] 在一个实施方案中，多元醇选自山梨糖醇、甘油、海藻糖和甘露醇或其组合。在一个实施方案中，多元醇不是甘露醇。在特定实施方案中，在本发明的组合物中的多元醇浓度是约 1 - 约 100 mg/mL、约 10 - 约 90 mg/mL、约 20 - 约 80 mg/mL、约 30 - 约 70 mg/mL、约 40 - 约 60 mg/mL 或约 50 - 约 60 mg/mL。在其他实施方案中，本发明的组合物例如冻干组合物包含以约 10-100 mg、约 10 - 约 90 mg/mL、约 20 - 约 80 mg/mL、约 30 - 约 70 mg/mL、约 40 - 约 60 mg/mL 或约 50 - 约 60 mg/mL 浓度的多元醇。在其他实施方案中，本发明的组合物例如适合于冻干的组合物包含约 1-50 mg/mL、约 10-30 mg/mL 或约 20-25 mg/mL 的多元醇。

[0084] 在另外其他实施方案中，本发明的组合物例如冻干组合物包含约 10-120、约、约 20-120、约 30-120、约 40-120、约 50-120、约 60-120、约 10-110、约 10-100、约 10-90、约 10-80、约 10-70 mg 的多元醇或其组合。对于上述浓度中间的多元醇范围和范围也预期是本发明的部分（例如约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 或约 100 mg/mL 的多元醇）。预期包括使用任何上述值的组合作为上和 / 或下限的多元醇浓度范围，例如 35-70 mg/ml 的多元醇。

[0085] 在一个实施方案中，用于在本发明的组合物中使用的合适多元醇是糖醇例如山梨糖醇。本发明的组合物可以包含 20-60 mg/mL、约 30-60 mg/mL、约 20-50 mg/mL 或约 35-45 mg/mL 的山梨糖醇。在一个实施方案中，组合物包含约 40 mg/mL 的山梨糖醇。

[0086] 在另一个实施方案中，用于在本发明的组合物中使用的合适多元醇是甘露醇。本发明的组合物可以包含约 1-50 mg/mL、约 10-40 mg/mL、约 20-30 mg/mL、约 20-25 mg/mL 的甘露醇。在一个实施方案中，组合物包含约 20 mg/mL 的甘露醇。在一个实施方案中，本发明的组合物例如适合于冻干的组合物包含约 1-50 mg/mL、约 10-30 mg/mL 或约 20-25 mg/mL 的甘露醇，且优选包含 20 mg/mL 甘露醇。在另外其他实施方案中，本发明的组合物例如冻干组合物包含约 40-60 mg、约 45-55 mg 或约 48-52 mg 的甘露醇。在一个实施方案中，组合物包含约 50 mg，例如约 49.5 mg 的甘露醇。

[0087] 在另一个实施方案中，用于在本发明的组合物中使用的合适多元醇是甘油。本发

明的组合物可以包含约 1-50 mg/mL、约 10-40 mg/mL、约 20-30 mg/mL、约 20-25 mg/mL 或约 20 mg/mL 的甘油。

[0088] 一种或多种糖也可以加入本发明的组合物中。在本发明的组合物中有用的糖的非限制性例子包括麦芽糖、乳糖、纤维二糖、龙胆二糖、蜜二糖和松二糖、果糖、左旋糖、葡萄糖和右旋糖、乳糖、蔗糖和海藻糖(也称为海藻糖或海藻糖)、棉子糖、松三糖、水苏糖和毛蕊花糖。在特定实施方案中,糖的浓度是约 1 - 约 120 mg/ml、约 1 - 约 100 mg/mL、约 10 - 约 90 mg/mL、约 20 - 约 80 mg/mL、约 30 - 约 70 mg/mL、约 40 - 约 60 mg/mL 或约 50 - 约 60 mg/mL。在其他实施方案中,本发明的组合物例如冻干组合物包含约 10-120、约 20-120、约 30-120、约 40-120、约 50-120、约 60-120、约 10-110、约 10-100、约 10-90、约 10-80、约 10-70 mg 的糖。

[0089] 在特定实施方案中,糖是蔗糖并且以约 10-100 mg/mL、约 10-90 mg/mL、约 10-80 mg/mL、约 10-70 mg/mL、约 20-90 mg/mL、约 20-80 mg/mL、约 20-70 mg/mL、约 30-70 mg/mL 或约 25-65 mg/mL 的蔗糖存在于本发明的组合物中。在一个实施方案中,组合物包含约 70 mg/mL 的蔗糖。在一个实施方案中,组合物例如适合于冻干的组合物包含约 5 mg/mL 的蔗糖。在一个实施方案中,组合物例如适合于冻干的组合物包含约 45 mg/mL 的蔗糖。在另一个实施方案中,组合物例如适合于冻干的组合物包含约 46 mg/mL 的蔗糖。

[0090] 在另外其他实施方案中,本发明的组合物例如冻干组合物包含约 1-100、约 1-70、约 1-50、约 10-120 mg、约 10-100 mg、约 10-50 mg、约 10-20 mg 或约 12 mg,例如约 12.25 mg 的蔗糖。在一个实施方案中,组合物例如冻干组合物包含约 50-120 mg、约 75 -120 mg 或约 100-120 mg 的蔗糖,例如约 110、11、112、113、114、115、116、117、118、119 或 120 mg 的蔗糖。在一个实施方案中,组合物例如冻干组合物包含约 113 mg 的蔗糖。在另一个实施方案中,组合物例如冻干组合物包含约 70 mg 的蔗糖。在另一个实施方案中,组合物例如冻干组合物包含约 20 mg 的蔗糖。在另一个实施方案中,组合物例如冻干组合物包含约 10 mg 的蔗糖。在另一个实施方案中,组合物例如冻干组合物包含约 5 mg 的蔗糖。

[0091] 在另一个实施方案中,糖是海藻糖。海藻糖可以以约 10-100 mg/mL、约 10-90 mg/mL、约 10-80 mg/mL、约 10-70 mg/mL、约 20-90 mg/mL、约 20-80 mg/mL、约 20-70 mg/mL、约 30-70 mg/mL、约 25-65 mg/mL 或约 35-55 mg/ml 存在于组合物中。在一个实施方案中,组合物例如适合于冻干的组合物包含约 40-50 mg/ml,例如约 45 mg/mL 的海藻糖。

[0092] 对于上述浓度中间的糖浓度和范围也预期是本发明的部分(例如约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24, 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119 或约 120 mg/mL 的糖)。预期包括使用任何上述值的组合作为上和 / 或下限的糖浓度范围,例如 35-70 mg/ml 的糖。

[0093] 在其他实施方案中,前述糖的一种或多种和前述多元醇中的一种或多种的任何组合可以一起包括在本发明的组合物中。例如,本发明的组合物例如适合于冻干的组合物可以包含多元醇例如甘露醇和糖例如蔗糖。在特定实施方案中,抗 NGF 抗体或其抗原结合片段与多元醇(例如甘露醇)、糖(例如蔗糖)或其组合(例如甘露醇和蔗糖)的摩尔比大于约

1:1200，优选大于约 1:1400，更优选在约 1:1400 - 1:1500 之间或大于约 1:1500。

[0094] 在本发明的特定实施方案中，组合物进一步包含氨基酸例如甲硫氨酸。在一个实施方案中，组合物包含约 1-10 mM、约 2-10 mM、约 2-9 mM、约 2-8 mM、约 2-7 mM、约 2-6 mM、约 2-5 mM、约 3-8 mM、约 3-7 mM、约 3-6 mM 或约 3-5 mM 的甲硫氨酸。在一个实施方案中，组合物包含约 4 mM 甲硫氨酸。在另一个实施方案中，组合物包含约 5 mM 甲硫氨酸。在一个实施方案中，包含甲硫氨酸的组合物还包含多元醇例如甘露醇和 / 或糖例如蔗糖。在一个实施方案中，组合物包含甲硫氨酸、甘露醇和蔗糖。在一个实施方案中，组合物不包含氨基酸例如甲硫氨酸。

[0095] 在本发明的特定实施方案中，组合物例如冻干组合物可以包含约 0.1-10 mg、0.5-9 mg、1.0-8 mg、1-6 mg、1-5 mg、1-4 mg、1-3 mg 或 1-2 mg，例如约 1.5、1.6、1.7、1.75、1.8、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.9 或 2.0 mg 的甲硫氨酸。在一个实施方案中，组合物例如冻干组合物包含约 1.8 mg，例如 1.83 mg 的甲硫氨酸。对于上述甲硫氨酸浓度和量中间的范围和量也预期是本发明的部分，例如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5 和 10 mM。此外，预期包括使用任何上述值的组合作为上和 / 或下限的值范围，例如 3.5- 9 mM。

[0096] 在一个实施方案中，组合物基本上不含防腐剂例如苯甲醇、苯酚、间甲酚、三氯叔丁醇和苄索氯铵。在另一个实施方案中，防腐剂可以包括在组合物中。一种或多种其他药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂例如 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版，Osol，A. 编辑（1980）中所述的那些可以包括在组合物中，条件是它们不会显著不利地影响组合物的所需特征。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度时对于接受者是无毒的，并且包括 ；另外的缓冲液 ；共溶剂 ；抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸 ；螯合剂例如 EDTA ；金属络合物（例如 Zn- 蛋白质络合物）；生物可降解的聚合物例如聚酯 ；和 / 或形成的盐抗衡离子例如钠。

[0097] 在特定实施方案中，本发明的药物组合物配制为包含下述、基本上由下述组成、或由下述组成的液体 ：（a）约 1-10、5-15、10-20、10-30、20-50 或 20-75 mg/mL 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段 ；（b）约 5-50、5-30、5-20 或 10-20 mM 组氨酸 ；和（c）约 0.01-0.02% 聚山梨醇酯 80 ；其中组合物的 pH 是约 5.0-6.0 或 5.5。在特定优选实施方案中，抗 NGF 抗体是 PG110 或 PG110 的抗原结合片段。在特定优选实施方案中，组氨酸的浓度是约 10 或 15 mM。

[0098] 在特定实施方案中，本发明的药物组合物配制为包含下述、基本上由下述组成、或由下述组成的液体 ：（a）约 1-10、5-15、10-20、10-30、20-50 或 20-75 mg/mL 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段 ；（b）约 5-50、5-30、5-20 或 10-20 mM 组氨酸 ；（c）约 0.01-0.02% 聚山梨醇酯 80 ；和（d）约 20-80、30-80 或 40-80 mg 的多元醇 ；其中组合物的 pH 是约 5.0-6.0 或 5.5。在特定优选实施方案中，抗 NGF 抗体是 PG110 或 PG110 的抗原结合片段。在特定优选实施方案中，组氨酸的浓度是约 10 或 15 mM。在特定优选实施方案中，多元醇是甘露醇或山梨糖醇。在其他优选实施方案中，多元醇的浓度是 20、30 或 40 mg/mL。在其他优选实施方案中，组合物进一步包含以约 10-20、20-50 或 30-80 mg/mL 的糖，优选蔗糖或海藻糖。

[0099] 在特定实施方案中，本发明的药物组合物配制为包含下述、基本上由下述组成、或由下述组成的液体 ：（a）约 1-10、5-15、10-20、10-30、20-50 或 20-75 mg/mL 的抗 NGF 抗体

或其抗原结合片段；(b)约 5-50、5-30、5-20 或 10-20 mM 组氨酸；(c)约 0.01-0.02% 聚山梨醇酯 80；和(d)约 20-80、30-80 或 40-80 mg/mL 的糖；其中组合物的 pH 是约 5.0-6.0 或 5.5。在特定优选实施方案中，抗 NGF 抗体是 PG110 或 PG110 的抗原结合片段。在特定优选实施方案中，组氨酸的浓度是约 10 或 15 mM。在特定优选实施方案中，糖是蔗糖或海藻糖。在其他优选实施方案中，糖的浓度是 70 或 80 mg/mL。在特定实施方案中，本发明的药物组合物以适合于重构为液体形式的冻干形式提供。对于每 mL 重构的液体，冻干组合物包含下述、基本上由下述组成、或由下述组成：(a)约 1-10、5-15、10-20、10-30、20-50 或 20-75 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段；(b)约 1-20、1-10、1-5 或 2-4 mg 组氨酸；和(c)约 0.1 - 0.2 mg 聚山梨醇酯 80。在特定优选实施方案中，组合物含有约 10、20 或 50 mg 的 PG110 或 PG110 的抗原结合片段。在特定优选实施方案中，组合物含有约 2-3 mg 组氨酸。在特定优选实施方案中，组合物含有 0.1 mg 聚山梨醇酯 80。

[0100] 在特定实施方案中，本发明的药物组合物以适合于重构为液体形式的冻干形式提供。对于每 mL 重构的液体，冻干组合物包含下述、基本上由下述组成、或由下述组成：(a)约 1-10、5-15、10-20、10-30、20-50 或 20-75 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段；(b)约 1-20、1-10、1-5 或 2-4 mg 组氨酸；(c)约 0.1 - 0.2 mg 聚山梨醇酯 80；和(d)约 20-80、30-80 或 40-80 mg 的多元醇。在特定优选实施方案中，组合物含有约 10、20 或 50 mg 的 PG110 或 PG110 的抗原结合片段。在特定优选实施方案中，组合物含有约 2-3 mg 组氨酸。在特定优选实施方案中，组合物含有 0.1 mg 聚山梨醇酯 80。在特定优选实施方案中，组合物含有 10、20、30 或 40 mg 甘露醇或山梨糖醇。在特定优选实施方案中，组合物进一步含有约 10-40 mg 的糖，优选蔗糖或海藻糖。

[0101] 在特定实施方案中，本发明的药物组合物以适合于重构为液体形式的冻干形式提供。对于每 mL 重构的液体，冻干组合物包含下述、基本上由下述组成、或由下述组成：(a)约 1-10、5-15、10-20、10-30、20-50 或 20-75 mg 的抗 NGF 抗体或其抗原结合片段；(b)约 1-20、1-10、1-5 或 2-4 mg 组氨酸；(c)约 0.1 - 0.2 mg 聚山梨醇酯 80；和(d)20-80、30-80 或 40-80 mg/mL 的糖。在特定优选实施方案中，组合物含有约 10、20 或 50 mg 的 PG110 或 PG110 的抗原结合片段。在特定优选实施方案中，组合物含有约 2-3 mg 组氨酸。在特定优选实施方案中，组合物含有 0.1 mg 聚山梨醇酯 80。在特定优选实施方案中，组合物含有约 20、40、70 或 80 mg 的糖，优选蔗糖或海藻糖。

[0102] 本发明的组合物还可以按需要与对于待治疗的具体适应症的一种或多种其他治疗剂组合，优选具有不会不利地影响组合物的抗体互补活性的那些。此类治疗剂适当地以对于预期目的有效的量存在于组合中。

[0103] 待用于体内施用的组合物必须是无菌的。这通过在组合物制备前或后经由无菌过滤膜过滤容易地完成。

[0104] 如上所述，本发明的组合物例如适于冻干的液体和冻干组合物具有有利的稳定性和贮存性质。液体组合物的稳定性不依赖于贮存形式，并且包括但不限于冷冻、冻干、喷雾干燥的组合物或活性成分悬浮于其中的组合物。稳定性可以在所选温度测量所选时间段。在本发明的一个方面，在液体组合物中的蛋白质以液体形式稳定至少约 3 个月；至少约 4 个月、至少约 5 个月；至少约 6 个月；至少约 12 个月；至少约 18 个月或更久。对于上述时间段中间的范围也预期是本发明的部分，例如约 9 个月等等。此外，预期包括使用任何上述值

的组合作为上和 / 或下限的值范围。

[0105] 优选地，组合物在室温、或在约 30℃或在 40℃稳定至少约 1 个月，和 / 或在约 2-8℃稳定至少约 1 年，或更优选在约 2-8℃稳定至少约 2 年。此外，组合物优选在组合物的冷冻（至例如 -80℃）和融化（在下文中称为“冻 / 融循环”）后是稳定的。在一个实施方案中，组合物在一个、两个、三个或更多个冻融循环后是稳定的。

[0106] 在液体组合物中蛋白质的稳定性还可以定义为在组合物中蛋白质的单体、聚集体或片段或其组合的百分比，例如如通过 UV 光散射或通过尺寸排阻层析测量的。在本发明的一个方面，稳定的液体组合物是具有小于约 10%，且优选小于约 5% 且更优选小于约 2% 蛋白质作为组合物中的聚集体存在的组合物。

[0107] 在一个实施方案中，根据搅拌应激测定例如 24 小时或 48 小时搅拌应激测定，通过测定组合物的浊度来测定液体组合物的物理稳定性。例如，搅拌应激测定可以通过下述执行 :将合适体积的液体组合物置于具有磁搅拌器（例如多点 HP，550 rpm）的烧杯中，在任何合适时间例如在 T0-T48 （小时）时取出等分试样，并且根据需要对等分试样执行合适测定。在相同条件下但不含搅拌的组合物样品充当对照。浊度测量可以使用来自 Hach （德国）的实验室浊度测量系统执行，并且报道为比浊法浊度单位（NTU）。

[0108] 本发明的组合物还具有有利的耐受性性质。耐受性基于受试者感觉到的注射部位疼痛评估进行估计，使用疼痛视觉类比量表（VAS）。（VAS）是测量疼痛的测量仪器，因为它范围跨越值的连续集，例如从无到极度量的疼痛。操作上，VAS 是水平线，长度约 100 mm，通过数目和 / 或词描述符锚定（anchored），例如 0 或 10，或‘无疼痛’或‘剧痛’，任选伴随在极端之间的另外的词或数目描述符，例如轻、中和重度 ;或 1 直到 9）（参见例如，Lee 等人（2000）Acad. Emerg. Med. 7:550）。

[0109] 可以测量的耐受性的另外指示物包括例如 Draize 量表（出血、瘀点、红斑、水肿、瘙痒）和挫伤。

[0110] III. 抗 NGF 抗体

可以在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体例如在下述中描述 :PCT 公开号 WO/2010/128398、PCT 公开号 WO 2001/78698、PCT 公开号 WO 2001/64247、PCT 公开号 WO 2002/096458、PCT 公开号 WO 2004/032870、PCT 公开号 WO 2004/058184、PCT 公开号 WO 2005/061540、PCT 公开号 WO 2005/019266、PCT 公开号 WO 2006/077441、PCT 公开号 WO 2006/131951、PCT 公开号 WO 2006/110883、PCT 公开号 WO 2009/023540、美国专利号 7,449,616 ;美国公开号 US 20050074821、美国公开号 US 20080033157、美国公开号 US 20080182978 或美国公开号 US 20090041717，所述专利各自的完整内容，特别是与抗 NGF 抗体有关的内容，在此引入本文作为参考。

[0111] 在一个实施方案中，待在药物组合物中使用的抗 NGF 抗体特征在于具有增强的体内稳定性，如通过在体内观察到的长期终末消除半衰期证明的。尽管不预期受机制限制，但认为抗体延长的终末消除半衰期起因于抗体的清除率减少而不是抗体分布体积中的增加。优选地，待在本发明的药物组合物中使用的抗体包括包含突变的人 IgG4 恒定区。优选的突变是铰链区突变。优选地，铰链区突变包含在 SEQ ID NO :9 （其中 SEQ ID NO :9 显示野生型人 IgG4 恒定区的氨基酸序列）的氨基酸位置 108 处的丝氨酸突变。更优选地，铰链区突变包含在 SEQ ID NO :9 的氨基酸位置 108 处丝氨酸至脯氨酸的突变。在优选实施方案中，

人 IgG4 恒定区包含 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列。

[0112] 在一个实施方案中，待在药物组合物中使用的抗 NGF 抗体显示出出乎意料的长终末消除半衰期，例如在食蟹猴中至少 15 天和一般在约 15 - 约 22 天的范围中(或在 15-22 天的范围中)、或在约 15 天 - 约 28 天的范围中(或在 15-28 天的范围中)、或在约 21 天 - 约 28 天的范围中(或在 21-28 天的范围中)的终末消除半衰期。这种稳定的抗 NGF 抗体还在大鼠中显示出至少 8 天，一般在约 8 - 约 9 天的范围中(或在 8-9 天的范围中)的终末消除半衰期。

[0113] 在一个实施方案中，用于在本发明的药物组合物中使用的优选抗 NGF 抗体，PG110，在食蟹猴中显示出至少 15 天和一般更久的平均终末消除半衰期。例如，在一项食蟹猴研究中，观察到在约 15 - 约 22 天的范围中的平均终末消除半衰期。在另一项食蟹猴研究中，观察到在约 21 - 约 28 天的范围中的平均终末消除半衰期。此外，PG110 在大鼠中显示出约 8 - 约 9 天的平均终末消除半衰期。再进一步地，如本领域已知的，IgG 在人中的终末消除半衰期是猴的约两倍，预测本发明的抗 NGF 抗体例如 PG110 在人中将具有至少 10-30 天、或至少 10 天、或至少 15 天、或至少 20 天、或至少 25 天、或更优选至少 30 天或至少 40 天、或在约 10 天 - 约 40 天的范围中(或在 10-40 天的范围中)、或在约 15 - 约 30 天的范围中(或在 15-30 天的范围中)的终末消除半衰期。另外或可替代地，抗体可以在人中显示出至少 30 天、或至少 35 天、或至少 40 天、或在至少四 - 六周的范围中(或在四 - 六周的范围中)、或在至少四 - 七周的范围中(或在四 - 七周的范围中)、或在至少四 - 八周的范围中(或在四 - 八周的范围中)的平均药理学半衰期。如实施例 8 中进一步描述的，本发明的本发明的抗 NGF 抗体已显示在人中具有在上述范围中的平均药理学半衰期。

[0114] 关于 PG110 在食蟹猴中的终末清除半衰期相当大地长于在本领域中对于其他 IgG4 抗体在食蟹猴中已报道的半衰期。例如，对于 CDP571，IgG4 抗 TNF 抗体(参见 Stephens，S. 等人(1995)*Immunol.* 85:668-674)，已报道在食蟹猴中约 40-90 小时(约 1.6-3.8 天)的半衰期。类似地，对于那他珠单抗，IgG 抗整联蛋白抗体(参见 Refusal CHMP Assessment Report for Natalizumab，European Medicines Agency，London，2007 年 11 月 15 日，Doc. Ref. EMEA/CHMP/8203/2008)，已报道在食蟹猴中约 3 天的半衰期。

[0115] 在一个实施方案中，本发明的药物组合物包含抗 NGF 抗体，其中优选的铰链区突变是在 SEQ ID NO :9 中的位置 108 处的丝氨酸至脯氨酸突变。这个突变先前已在本领域中得到描述(参见 Angal，S. 等人(1993)*Mol. Immunol.* 30:105-108)，并且报道为取消 IgG4 分子的异质性，特别是含有单条重链和单条轻链的半抗体形成。相应地，本发明还包含除了在 SEQ ID NO :9 中的位置 108 处之外的置换，其中所述置换在消除 IgG4 分子的异质性(例如半抗体的形成)方面实现与 Ser 至 Pro 突变一样的效应。在位置 108 处的突变消除 IgG4 分子的异质性的能力可以如 Angal 等人(1993)，同上中所述进行评估。

[0116] 除了在 SEQ ID NO :9 的位置 108 处的修饰外，或作为在 SEQ ID NO :9 的位置 108 处的修饰的替代方案，改善 FcRn-IgG 相互作用的亲和力的其他 IgG 铰链区突变已得到描述，导致对于修饰的 IgG 延长的半衰期。此类另外或可替代的修饰的例子包括在对应于下述的一个或多个 IgG 恒定区残基上的突变 :Thr250、Met252、Ser254、Thr256、Thr307、Glu308、Met428、His433 和 / 或 Asn434 (如 Shields，R.L. 等人(2001)*J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 ;Petkova，S.B. 等人(2006)*Int. Immunol.* 18:1759-1769 ;Hinton，P.R. 等

人(2004)*J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 ;Kamei,D.T. 等人(2005)*Biotechnol. Bioeng.* 92:748-760 ;Vaccaro,C. 等人(2005)*Nature Biotechnol.* 23:1283-1288 ;Hinton,P.R. 等人(2006)*J. Immunol.* 176:346-356 中进一步描述的)。

[0117] 再进一步地,作为铰链区突变的替代方案,IgG4 恒定区的其他稳定修饰已得到描述。例如,在其他实施方案中,人 IgG4 恒定区的突变包含 IgG4 CH3 区由 IgG1 CH3 区的置换,IgG4 CH2 和 CH3 区由 IgG1CH2 和 CH3 区的置换,或在 IgG4 恒定区的位置 409 处(根据 Kabat 编号)的精氨酸由赖氨酸的置换,如美国专利公开 20080063635 中进一步描述的。在另外其他实施方案中,人 IgG4 恒定区的突变包含 Arg409、Phe405 或 Lys370(根据 Kabat 编号)的置换,例如 Arg409 由 Lys、Ala、Thr、Met 或 Leu 的置换,或 Phe405 由 Ala、Val、Gly 或 Leu 的置换,如 PCT 公开 WO 2008/145142 中进一步描述的。

[0118] 使用标准重组 DNA 技术例如编码人 IgG4 恒定区的核酸的定点诱变或 PCR 介导的诱变,可以将所需突变引入人 IgG4 恒定区结构域内。此外,编码抗体重链可变区的 DNA 可以引入编码突变的人 IgG4 恒定区的表达载体内,从而使得可变区和恒定区变得可操作地连接的,从而创造编码全长免疫球蛋白重链的载体,其中恒定区是突变的人 IgG4 恒定区。表达载体随后可以用于表达全长免疫球蛋白重链,使用标准重组蛋白质表达方法。例如,本发明的抗 NGF 抗体可以如实施例 1 中进一步详细描述的进行构建。

[0119] 抗体的终末消除半衰期可以使用本领域已知的标准方法进行测定。例如,在抗体施用于受试者(例如食蟹猴、Sprague-Dawley 大鼠)后,可以在施用后的不同时间点获得血样,并且可以使用本领域已知用于测定抗体浓度的技术(例如 ELISA 测定)测定来自血样的血清中的抗体浓度。抗体的终末半衰期的计算可以使用已知的药物代谢动力学方法来完成,例如使用设计为计算药物代谢动力学参数的计算机系统和软件(其非限制性例子是 SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 与 WinNonlin 软件)。

[0120] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物含有抗 NGF 抗体或其抗原结合部分,包含 PG110 抗体的重和轻链可变区。PG110 的重链可变区显示于 SEQ ID NO :1 中,并且 PG110 的轻链可变区显示于 SEQ ID NO :2 中。相应地,在一个实施方案中,本发明的抗 NGF 抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的重链可变区。在另一个实施方案中,本发明的抗 NGF 抗体包括包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的轻链可变区。在另外一个实施方案中,本发明的抗 NGF 抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0121] PG110 重链(可变区和恒定区)的全长氨基酸序列显示于 13 中。这条重链可以由前体重链制备,所述前体重链包括引导或信号序列,例如 SEQ ID NO :12 中所述的氨基酸序列。SEQ ID NO :12 的前体重链由 SEQ ID NO :11 中所示的核苷酸序列编码。

[0122] PG110 轻链(可变区和恒定区)的全长氨基酸序列显示于 16 中。这条轻链可以由前体轻链制备,所述前体轻链包括引导或信号序列,例如 SEQ ID NO :15 中所述的氨基酸序列。SEQ ID NO :15 的前体轻链由 SEQ ID NO :14 中所示的核苷酸序列编码。

[0123] 相应地,在另一个实施方案中,用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体包括包含 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列的重链,其中所述抗体在食蟹猴中具有至少 15 天的血清半衰期。在另一个实施方案中,在食蟹猴中的血清半衰期可以在约 15 天 - 约 22 天的范围中(或在 15-22 天的范围中)。在其他实施方案中,在大鼠中的血清半衰期可以是至少

8 天或在约 8 天 - 约 9 天的范围中(或在 8-9 天的范围中)。在另外其他实施方案中,在人中的血清半衰期可以是至少 10-30 天、或至少 10 天、或至少 15 天、或至少 20 天、或至少 25 天、或至少 30 天或至少 40 天、或在约 10 天 - 约 40 天的范围中(或在 10-40 天的范围中)、或在约 15 - 约 30 天的范围中(或在 15-30 天的范围中)的终末消除半衰期。另外或可替代地,抗体可以在人中显示出至少 30 天、或至少 35 天、或至少 40 天、或在至少四 - 六周的范围中(或在四 - 六周的范围中)、或在至少四 - 七周的范围中(或在四 - 七周的范围中)、或在至少四 - 八周的范围中(或在四 - 八周的范围中)的平均药理学半衰期。优选地,重链由 SEQ ID NO :11 的核苷酸序列编码。优选地,抗体的轻链包含 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列。优选地,轻链由 SEQ ID NO :14 的核苷酸序列编码。

[0124] 在另外一个实施方案中,用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体包括包含 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列的重链,和包含 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列的轻链。

[0125] 在另外一个实施方案中,用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体包含由 SEQ ID NO :11 的核苷酸序列编码的重链,和由 SEQ ID NO :14 的核苷酸序列编码的轻链。

[0126] 考虑到 PG110 的结合特异性由可变结构域的互补决定区(CDRs)提供,在另一个实施方案中,用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体包含 PG110 的重链、PG110 的轻链或两者的 CDRs。PG110 的重链 CDRs 1、2 和 3 分别显示于 SEQ ID NOs :3、4 和 5 中。PG110 的轻链 CDRs 1、2 和 3 分别显示于 SEQ ID NOs :6、7 和 8 中。相应地,在一个实施方案中,本发明的抗 NGF 抗体包含重链可变区,其包含分别具有 SEQ ID NOs :3、4 和 5 的氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3。在另一个实施方案中,用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体包含轻链可变区,其包含分别具有 SEQ ID NOs :6、7 和 8 的氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3。在另外一个实施方案中,用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体包含重链可变区,其包含分别具有 SEQ ID NOs :3、4 和 5 的氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3,且包含轻链可变区,其分别具有 SEQ ID NOs :6、7 和 8 的氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3。

[0127] 在另外一个实施方案中,用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体可以包含重和轻链可变区,其包含与 PG110 的重和 / 或轻链可变区同源的氨基酸序列,并且其中所述抗体保留由 PG110 显示出的增强的体内稳定性。例如,抗 NGF 抗体的重链可变区可以包含氨基酸序列,其与 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列至少 90% 同源、更优选至少 95% 同源、更优选至少 97% 同源、并且甚至更优选至少 99% 同源。抗 NGF 抗体的轻链可变区可以包含氨基酸序列,其与 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列至少 90% 同源、更优选至少 95% 同源、更优选至少 97% 同源、并且甚至更优选至少 99% 同源。

[0128] 如本文使用的,在两个氨基酸序列之间的同源性百分比等价于在两个序列之间的同一性百分比。在两个序列之间的同一性百分比是由序列共享的等同位置数目的函数(即,% 同源性 = 等同位置 #/ 总位置 # x 100),考虑缺口数目和每个缺口的长度,所述缺口需要被引入用于两个序列的最佳比对。序列比较和在两个序列之间的同一性百分比测定可以使用数学算法来完成。例如,在两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用 E. Meyers 和 W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988))的算法进行测定,其已掺入 ALIGN 程序(版本 2.0)内,使用 PAM120 权重残基表、缺口长度罚分 12 和缺口罚分 4。另外,在两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用 Needleman 和 Wunsch(*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970))算法进行测定,其已掺入 GCG 软件包(可在 http://www.gcg.com 处获

得)中的 GAP 程序内,使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵,以及缺口权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6。

[0129] 在另外一个实施方案中,用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体可以包含重和轻链可变区,其包含 PG110 的重和 / 或轻链可变区的氨基酸序列,但其中一个或多个保守置换已引入一个或多个序列内,而抗体保留由 PG110 显示出的增强的体内稳定性。例如,抗 NGF 抗体的重链可变区可以包含这样的氨基酸序列,其等同于 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,除了与 SEQ ID NO :1 相比较的 1、2、3、4 或 5 个保守氨基酸置换外。抗 NGF 抗体的轻链可变区可以包含这样的氨基酸序列,其等同于 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列,除了与 SEQ ID NO :2 相比较的 1、2、3、4 或 5 个保守氨基酸置换外。

[0130] 如本文使用的,术语“保守氨基酸置换”意指不会显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合或稳定性特征的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸置换、添加和缺失。通过本领域已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变,可以将修饰引入本公开内容的抗体内。保守氨基酸置换是其中氨基酸残基替换为具有类似侧链的氨基酸残基的置换。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不荷电极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、β 分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,在 PG110 的可变区内的一个或多个氨基酸残基可以替换为来自相同侧链家族的其他氨基酸残基,并且可以使用本文描述的功能测定就保留的功能测试改变的抗体。

[0131] 在另外一个实施方案中,用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体包含抗原结合区(即可变区),其结合在 NGF 上与 PG110 抗体相同的表位,或与 PG110 交叉竞争结合 NGF。相应地,在一个实施方案中,本发明的抗 NGF 抗体与这样的抗体竞争结合 NGF,所述抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0132] 此类交叉竞争抗体可以基于其在标准 NGF 结合测定中与 PG110 交叉竞争的能力进行鉴定。例如,可以使用标准 ELISA 测定,其中将重组 NGF 蛋白质(例如人 NGF-β)固定在板上,抗体之一是荧光标记的,并且估计非标记的抗体竞争掉(compete off)标记抗体的结合的能力。另外或可替代地,BIAcore 分析可以用于评估抗体交叉竞争的能力。可以用于测试抗体与这样的抗体(其包括包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的轻链可变区)竞争结合 NGF 的能力的合适结合测定先前已得到描述(例如 WO/2010/128398)。

[0133] 在另外其他实施方案中,在本发明的组合物中有用的抗 NGF 抗体显示出 PG110 抗体的一种或多种功能性质。例如,本发明的抗 NGF 抗体可以显示出下述功能性质中的一种或多种 :

- 与人 NGF 结合,但不与人脑源性神经营养因子(BDNF)、人神经营养蛋白 3 (NT-3)或人神经营养蛋白 4 (NT-4)结合 ;
- 以 100 pM 或更少的 K_D 与人或大鼠 NGF 结合 ;
- 抑制 NGF 与 TrkA 或 $p75^{NTR}$ 的结合 ;

- 抑制 TF-1 细胞的 NGF 依赖性增殖；
- 抑制 NGF 依赖性鸡背根神经节存活；
- 抑制 NGF 依赖性 PC12 细胞神经突长出。

[0134] 这些功能性质可以使用本领域已知并且在例如 WO/2010/128398 中描述的体外测定进行评估。就抗体与人 NGF 的特异性结合而言，如本文使用的术语“不与脑源性神经营养因子(BDNF)、人神经营养蛋白 3 (NT-3)或人神经营养蛋白 4 (NT-4)结合”意指在标准结合测定(例如 ELISA 或如实施例中所述的其他合适的体外测定)中观察到的抗体与 BDNF、NT-3 或 NT-4 结合的量与结合的本底水平(例如对于对照抗体)类似，例如不超过本底水平多于 2 倍，或与人 NGF 的结合相比较，与 BDNF、NT-3 或 NT-4 小于 5% 的结合(其中与人 NGF 的结合水平设为 100% 结合)。

[0135] 在另外一个实施方案中，用于在本发明的药物组合物中使用的抗神经生长因子(NGF)抗体包含人 IgG4 恒定区，其中人 IgG4 恒定区包含 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列(或其中人 IgG4 恒定区包含在 SEQ ID NO :9 的氨基酸位置 108 处的丝氨酸突变，优选在位置 108 处的丝氨酸至脯氨酸突变)，并且其中所述抗体以 100 pM 或更少的 K_D (或可替代地，以 300 pM 或更少、200 pM 或更少、150 pM 或更少、75 pM 或更少或 50 pM 或更少的 K_D) 与人或大鼠 NGF 结合，以 250 pM 或更少的 IC_{50} (或可替代地，以 500 pM 或更少 400 pM 或更少、300 pM 或更少或 200 pM 或更少) 的 IC_{50} 抑制 NGF 与 TrkA 或 $p75^{NTR}$ 的结合，并且以 50 ng/ml 或更少的 IC_{50}(或可替代地，以 150 ng/ml 或更少、100 ng/ml 或更少、75 ng/ml 或更少或 40 ng/ml 或更少的 IC_{50}) 抑制 TF-1 细胞的 NGF 依赖性增殖。优选地，抗体在人中具有至少 10-30 天、或至少 10 天、或至少 15 天、或至少 20 天、或至少 25 天、或至少 30 天、或在约 10 天 - 约 40 天的范围中(或在 10-40 天的范围中)、或在约 15 天 - 约 30 天的范围中(或在 15-30 天的范围中)的平均终末消除半衰期。另外或可替代地，抗体可以在人中显示出至少 30 天、或至少 35 天、或至少 40 天、或在至少四 - 六周的范围中(或在四 - 六周的范围中)、或在至少四 - 七周的范围中(或在四 - 七周的范围中)、或在至少四 - 八周的范围中(或在四 - 八周的范围中) 的平均药理学半衰期。另外或可替代地，抗体可以在食蟹猴中显示出至少 15 天和一般在约 15 - 约 22 天的范围中(或在 15-22 天的范围中)、或在约 15 天 - 约 28 天的范围中(或在 15-28 天的范围中)、或在约 21 天 - 约 28 天的范围中(或在 21-28 天的范围中) 的平均终末消除半衰期。另外或可替代地，抗体可以在大鼠中显示出至少 8 天，一般在约 8 - 约 9 天的范围中(或在 8-9 天的范围中)的终末消除半衰期。抗体可以进一步显示出一种或多种另外的功能性质，例如与人 NGF 结合，但不与人脑源性神经营养因子(BDNF)、人神经营养蛋白 3 (NT-3) 或人神经营养蛋白 4 (NT-4) 结合；抑制 NGF 依赖性鸡背根神经节存活；和 / 或抑制 NGF 依赖性 PC12 细胞神经突长出。优选地，在单次剂量的抗 NGF 抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约一周到约十二周的持续时间。优选地，抗体包括包含 CDRs 1、2 和 3 的重链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs :3、4 和 5 的氨基酸序列，或抗体包括包含 CDRs 1、2 和 3 的轻链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs :6、7 和 8 的氨基酸序列，或抗体包括包含 CDRs 1、2 和 3 的重链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs :3、4 和 5 的氨基酸序列，和包含 CDRs 1、2 和 3 的轻链可变区，所述 CDRs 1、2 和 3 分别具有 SEQ ID NOs :6、7 和 8 的氨基酸序列。优选地，抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的重链可变区，或抗体包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的轻链可变

区，或抗体包括包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区，和包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区，或抗体与这样的抗体竞争结合NGF，所述抗体包括包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区，和包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区。

[0136] 在另外其他实施方案中，当施用于受试者时(例如抗体以这样的剂量和频率施用，从而使得回弹作用在受试者中被避免)，用于在本发明的药物组合物中使用的抗NGF抗体不显示出回弹作用。其中在单次或反复施用后的最初有效性时期后，抗NGF抗体在受试者中显示出功效减少的回弹作用，已在其他抗NGF抗体的动物模型和临床研究中得到报道。例如，对于抗大鼠NGF抗体，在大鼠中的慢性压迫性损伤(CCI)模型中报道称为“回弹现象”的此类效应(Ro,L-S.等人(1999)*Pain*79:265-274)。另外，已报道了用抗NGF抗体tanezumab(也称为RN624，E3，CAS登记号880266-57-9))的临床疼痛研究，其中在最初止痛期后观察到增加的不利事件时期，例如对于触摸和‘别针和针(pins & needles)’知觉的敏感性(参见由Hefti，Franz F.，Rinat Neuroscience，LSUHSC，Shreveport，Louisiana，2006年9月26日的呈现)。尽管不预期受机制限制，但认为本文描述的抗NGF抗体的延长终末消除半衰期允许其避免显示出回弹作用。因此，在本发明的组合物中使用的抗NGF抗体的其他优点包括与其他现有技术抗NGF抗体相比较，在体内更一致和延长的活性。考虑到此类抗NGF抗体的延长终末消除半衰期，可以使用更低的剂量(与其他抗NGF抗体相比较)，并且需要时包含抗体的组合物可以以更频繁的间隔使用，从而使得剂量和定时治疗方案可以这样选择，从而使得回弹作用在受试者中被避免。

[0137] 在另外一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，用于在本发明的药物组合物中使用的抗NGF抗体能够在受试者中长持续时间减轻疼痛，例如抗体能够减轻疼痛至少约一周到约十二周(或一周到十二周)的持续时间。在一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约一周(或至少一周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约两周(或至少两周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约四周(或至少四周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约八周(或至少八周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约十二周(或至少十二周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约四周到约十二周(或四周到十二周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约八周到约十二周(或八周到十二周)的持续时间。

[0138] 抗体减轻受试者中的疼痛的能力可以使用本领域确定的测定进行评估。用于评估抗NGF抗体引起的疼痛减轻持续时间的合适动物模型在例如PCT公开号WO 2006/131951和美国专利公开20080182978中描述。此类动物模型的非限制性例子包括通过坐骨神经的慢性压迫诱发的神经性疼痛模型，涉及后爪的切口的手术后疼痛模型，涉及完全弗氏佐剂(CFA)诱导的关节炎的类风湿性关节炎疼痛模型，和例如Halvorson，K.G.等人(2005)*Cancer Res.* 65:9426-9435和Sevcik，M.A.等人(2005)*Pain*115:128-141中描述的癌症疼痛模型。此外，疼痛减轻可以在人中临床估计，并且疼痛减轻的持续时间可以基于由用抗NGF抗体治疗的一个或多个人受试者报道的疼痛水平进行测定。

[0139] 在另外其他实施方案中，用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体可以包含抗 NGF 抗体的重链可变区和 / 或轻链可变区，所述抗 NGF 抗体通过本领域已知用于产生单克隆抗体的标准方法进行制备，例如由 Kohler 和 Milstein (1975)*Nature* 256 :495 描述的标准体细胞杂交技术，以创造非人单克隆抗体(所述抗体随后可以是人源化的)，以及噬菌体展示文库技术或使用表达人免疫球蛋白基因的转基因动物的方法。用于选择抗体的噬菌体展示文库技术在下述参考文献中描述 :例如 McCafferty 等人，*Nature*，348:552-554 (1990). Clarkson 等人，Nature，352:624-628 (1991)，Marks 等人，*J. Mol. Biol.*，222:581-597(1991)和 Hoet 等人(2005)*Nature Biotechnology* 23，344-348 ;授予 Ladner 等人的美国专利号 5,223,409 ;5,403,484 ;和 5,571,698 ;授予 Dower 等人的美国专利号 5,427,908 和 5,580,717 ; 授予 McCafferty 等人的美国专利号 5,969,108 和 6,172,197 ;以及授予 Griffiths 等人的美国专利号 5,885,793 ;6,521,404 ;6,544,731 ;6,555,313 ;6,582,915 和 6,593,081。使用表达人免疫球蛋白基因的转基因动物以产生抗体的方法在下述参考文献中描述 :例如 Lonberg 等人(1994) Nature 368 (6474) :856-859 ;Lonberg，N. 和 Huszar，D. (1995)*Intern. Rev. Immunol.* 13 :65-93，Harding，F. 和 Lonberg，N. (1995)*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546 ;美国专利号 5,545,806 ;5,569,825 ;5,625,126 ;5,633,425 ;5,789,650 ;5,877,397 ;5,661,016 ;5,814,318 ;5,874,299 ; 和 5,770,429 ;都授予 Lonberg 和 Kay ;授予 Surani 等人的美国专利号 5,545,807 ;都授予 Lonberg 和 Kay 的 PCT 公开号 WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884 和 WO 99/45962 ;授予 Ishida 等人 PCT 公开 WO 02/43478，授予 Kucherlapati 等人美国专利号 5,939,598 ;6,075,181 ;6,114,598 ;6,150,584 和 6,162,963。

[0140] 在各种实施方案中，用于在本发明的组合物中使用的抗 NGF 抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。此外，抗体可以是其中潜在的 T 细胞表位已消除的抗体。消除潜在的 T 细胞表位从而减少抗体的潜在免疫原性的方法已在本领域中得到描述(参见例如 Carr 等人的美国专利公开号 20030153043)。

[0141] 本发明的抗体或抗体部分可以衍生或连接至另一种功能分子(例如另一种肽或蛋白质)。相应地，用于在本发明的药物组合物中使用的抗体和抗体部分预期包括本文描述的 PG110 抗体的衍生和其他修饰形式。例如，本发明的抗体或抗体部分可以功能连接(通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式) 至一种或多种其他分子实体，例如另一种抗体(例如双特异性抗体或双抗体)、可检测试剂、细胞毒素剂、药物试剂和 / 或蛋白质或肽，其可以介导抗体或抗体部分与另一种分子(例如链霉抗生物素蛋白核心区或多组氨酸标签) 的结合。

[0142] 一类衍生抗体通过将两种或多种抗体交联(具有相同类型或不同类型，例如以创造双特异性抗体) 而产生。合适的交联剂包括其为具有由合适的间隔物分隔的两个不同反应基团的异双功能(例如间马来酰亚胺基苯甲酸 -N- 羟基琥珀酰亚胺酯) 或同双功能(例如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯) 的那些。此类接头可从 Pierce Chemical Company，Rockford，IL 获得。

[0143] 本发明的抗体或抗体部分可以与之衍生的有用的可检测试剂包括荧光化合物。示例性荧光可检测试剂包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5- 二甲氨基 -1- 萘磺酰氯、藻红蛋白等。抗体还可以用可检测酶例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等衍

生。当抗体用可检测酶衍生时，它通过加入另外试剂进行检测，酶使用所述另外试剂以产生可检测的反应产物。例如，当存在可检测试剂辣根过氧化物酶时，过氧化氢和二氨基联苯胺的添加导致可检测的显色反应产物。抗体还可以用生物素衍生，并且通过抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白结合的间接测量进行检测。

[0144] IV. 抗体产生

用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体可以使用编码抗 NGF 抗体的核酸分子生产。核酸可以以全细胞、细胞裂解产物或部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术包括碱 /SDS 处理、CsCl 结合、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域众所周知的其他技术，纯化掉其他细胞组分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白质时，核酸是“分离的”或“致使基本上纯的”。参见 F. Ausubel 等人，编辑（1987）Current Protocols in Molecular Biology，Greene Publishing and Wiley Interscience，New York。本公开内容的核酸可以是例如 DNA 或 RNA，并且可以含有或不含内含子序列。在优选实施方案中，核酸是 cDNA 分子。本公开内容的核酸可以使用标准分子生物学技术获得。

[0145] 在一个实施方案中，用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体由包含 SEQ ID NO :11 的核苷酸序列的核酸分子编码。在另一个实施方案中，用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体由包含 SEQ ID NO :14 的核苷酸序列的核酸分子编码。

[0146] 一旦获得编码 V_H 和 V_L 区段的 DNA 片段，这些 DNA 片段就可以通过标准重组 DNA 技术进一步处理，例如以将可变区基因转换为全长抗体链基因，从而使得可变区与恒定区可操作地连接（参见例如，实施例 1）。如在这个背景中使用的，术语“可操作地连接的”意指两个 DNA 片段这样连接，从而使得由两个 DNA 片段连接的氨基酸序列保持在框内（in-frame）。

[0147] 用于在本发明的药物组合物中使用的抗体可以使用本领域已知的方法在宿主细胞中产生（例如 Morrison，S.（1985）*Science* 229:1202）。例如，为了表达抗体，可以将编码重和轻链的 DNAs 这样插入表达载体内，从而使得基因与转录和翻译控制序列可操作地连接。在这个背景中，术语“可操作地连接”意指抗体基因这样连接到载体内，从而使得在载体内的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因的转录和翻译的预期功能。表达载体和表达控制序列选择为与使用的表达宿主细胞相容。抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入分离的载体内，或更一般地，将两种基因都插入相同表达载体内。通过标准方法（例如在抗体基因片段和载体上的互补限制位点的连接，或如果不存在限制位点，那么平端连接），将抗体基因插入表达载体内。另外，重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞中分泌的信号肽。抗体链基因可以这样克隆到载体内，从而使得信号肽在框内连接至抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽（即来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽）。

[0148] 除了抗体链基因外，重组表达载体一般携带调节序列，其控制抗体链基因在宿主细胞中的表达。术语“调节序列”预期包括启动子、增强子和其他表达控制元件（例如多腺苷酸化信号），其控制抗体链基因的转录或翻译。此类调节序列例如在 Goeddel（Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185，Academic Press，San Diego，CA（1990））中描述。本领域技术人员应当理解，表达载体的设计包括调节序列的选择，可以取决于此类因素如待转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白质表达水平等。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平的蛋白质表达的病毒元

件，例如衍生自巨细胞病毒（CMV）、猴病毒 40 （SV40）、腺病毒（例如腺病毒主要晚期启动子（AdMLP）和多瘤的启动子和 / 或增强子。可替代地，可以使用非病毒调节序列，例如遍在蛋白启动子或 β - 珠蛋白启动子。再进一步地，调节元件由来自不同来源的序列组成，例如 SRα 启动子序列，其含有来自 SV40 早期启动子的序列和人 T 细胞白血病病毒 1 型的长末端重复序列（Takebe，Y. 等人（1988）*Mol. Cell. Biol.* 8:466-472）。

[0149] 除了抗体链基因和调节序列外，重组表达载体可以携带另外的序列，例如调节载体在宿主细胞中的复制的序列（例如复制起点）和可选标记基因。可选标记基因促进载体已引入其内的宿主细胞的选择（参见例如，都由 Axel 等人的美国专利号 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017）。例如，一般地，可选标记基因对载体已引入其内的宿主细胞赋予对于药物例如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤的抗性。优选的可选标记基因包括二氢叶酸还原酶（DHFR）基因（用于与氨甲蝶呤选择 / 扩增一起在 dhfr- 宿主细胞中使用）和 neo 基因（用于 G418 选择）。

[0150] 对于轻和重链的表达，通过标准技术将编码重和轻链的一个或多个表达载体转染到宿主细胞内。多个形式的术语“转染”预期包含通常用于将外源 DNA 引入原核或真核宿主细胞内的广泛多样的技术，例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE- 葡聚糖转染等。尽管理论上可以在原核或真核宿主细胞中表达抗体，但在真核细胞且最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体是最优选的，因为此类真核细胞且特别是哺乳动物细胞比原核细胞更可能装配且分泌适当折叠和免疫学活性的抗体。抗体基因的原核表达已报道对于高得率活性抗体的生产是无效的（Boss，M. A. 和 Wood，C. R. （1985）*Immunology Today* 6:12-13）。

[0151] 用于表达本公开内容的重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢（CHO 细胞）（包括在 Urlaub 和 Chasin，（1980）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 中描述的 $dhfr^-$ CHO 细胞，与例如如 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp（1982）*J. Mol. Biol.* 159:601-621 中所述的 DHFR 可选标记一起使用）、NSO 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。另一种优选的表达系统是公开于 WO 87/04462（授予 Wilson）、WO 89/01036（授予 Bebbington）和 EP 338,841 （授予 Bebbington）中的 GS 基因表达系统。当编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞内时，通过将宿主细胞培养足以允许抗体在宿主细胞中表达、或更优选地抗体分泌到宿主细胞在其中生长的培养基内的时间段产生抗体。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0152] 在一个实施方案中，用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体使用表达载体产生，其中所述载体包含编码抗体重链的 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列，和编码抗体轻链的 SEQ ID NO:14 的核苷酸序列。优选的表达载体包含 GS （谷氨酰胺合成酶）基因。在另一个优选实施方案中，本发明优选的宿主细胞是 CHO （中国仓鼠卵巢）细胞。

[0153] 在另外一个优选实施方案中，用于在本发明的药物组合物中使用的抗 NGF 抗体通过培养包含表达载体的宿主细胞产生，所述表达载体包含 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列（编码抗体重链）和 SEQ ID NO:14 的核苷酸序列（编码抗体轻链），从而使得表达包含由 SEQ ID NO:11 编码的重链和由 SEQ ID NO:14 编码的轻链的抗 NGF 抗体。

[0154] V. 施用方法

本发明的药物组合物可以通过本领域已知的多种方法进行施用。如技术人员应当理解的，施用途径和 / 或方式将取决于所需结果而改变。一般地，本发明的药物组合物适合于静

脉内、关节内、皮下、肌内、肠胃外、瘤内、鼻内、血管内(intravesicular)、滑膜内、经口、粘膜、舌下、脊柱或表皮施用或通过滴注到体腔(例如腹、胸膜腔、鼻旁窦)。在特定优选实施方案中,本发明的药物组合物适合于静脉内、皮下(例如经由注射笔)或关节内施用。

[0155] 本发明的药物组合物可以单独或在组合疗法中即与其他试剂组合施用。例如,组合疗法可以包括本发明的组合物与至少一种或多种另外的药物试剂。例如,至少一种或多种另外的药物试剂可以分开施用,或还可以掺入到组合物内。在优选实施方案中,包含抗NGF抗体或其抗原结合片段的本发明的药物组合物与第二种药物试剂组合施用,其中所述第二种药物试剂选自NSAIDs、镇痛药(包括阿片类镇痛药和非典型镇痛药)、局麻药、神经阻滞、酚封闭、治疗抗体、类固醇、抗惊厥药、抗抑郁药、局部辣椒素(capsaicin)和抗病毒药。用于在疼痛减轻中使用的特定优选类别的第二种药物试剂是阿片类镇痛药。另外或可替代地,第二种治疗方案可以与本发明的抗体的使用例如在疼痛减轻中组合。此类第二种治疗方案的例子包括放射疗法(例如用于癌症疼痛)、手术程序(例如用于三叉神经痛的半月神经节和半月神经节后根消融(针)程序)、催眠状态和针灸。

[0156] NSAIDS的例子包括乙酰化水杨酸酯包括阿司匹林;非乙酰化水杨酸酯包括双水杨酯、二氟尼柳;乙酸包括依托度酸、双氯芬酸、吲哚美辛、酮咯酸、萘丁美酮;丙酸包括非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、酮洛芬、萘普生、萘普生钠、奥沙普秦;灭酸酯包括甲氯灭酸酯、甲芬那酸;保泰松、吡罗昔康;COX-2抑制剂包括塞来昔布、依托考昔、伐地考昔、罗非昔布、鲁米考昔。镇痛药的例子包括扑热息痛(对乙酰氨基酚)、曲马多、他喷他多(tapentadol)、辣椒素(局部)、阿片类镇痛药和非典型镇痛药。阿片类镇痛药的例子包括吗啡、可待因、蒂巴因、氢吗啡酮、氢可酮、氧可酮、羟吗啡酮、地索吗啡、二乙酰吗啡、尼可吗啡、二丙酰吗啡、苄吗啡、乙基吗啡、芬太尼、哌替啶、美沙酮、曲马多和丙氧芬。非典型镇痛药的例子包括三环抗抑郁药、卡马西平、加巴喷丁、普瑞巴林、度洛西汀和咖啡因。类固醇的例子包括关节内皮质类固醇(IACs)和泼尼松。治疗抗体的例子包括抗TNF抗体,例如Remicade®和Humira®,和抗CD20抗体例如Rituxan®和Arzerra™。抗病毒剂的例子包括阿昔洛韦和磷酸奥司他韦(Tamiflu®)。

[0157] 在优选实施方案中,组合疗法可以包括本发明的抗NGF抗体药物组合物与至少一种或多种TrkA抑制剂(例如拮抗TrkA活性的化合物)。TrkA抑制剂可以例如通过与TrkA受体细胞外相互作用或通过与TrkA发信号转导机制细胞内相互作用(例如TrkA激酶活性的抑制)来起作用。细胞外TrkA抑制剂的非限制性例子包括抗TrkA抗体(例如美国专利公开号20090208490和美国专利公开号20090300780中所述的人源化抗TrkA抗体)和拮抗TrkA的NGF肽模拟物(例如在Debeir,T.等人(1999)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*96:4067-4072中描述的)。细胞内TrkA抑制剂的非限制性例子包括拮抗TrkA功能的细胞穿透肽(例如如2010年3月30日出版的Hirose,M.等人(2008)*J. Pharmacol. Sci.* 106:107-113;Ueda,K.等人(2010)*J. Pharmacol. Sci.*中所述),和小分子抑制剂例如TrkA激酶抑制剂(例如如Wood,E.R.等人(2004)*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:953-957;Tripathy,R.等人(2008)*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:3551-3555中所述)。TrkA抑制剂的其他非限制性例子包括ARRY-470和ARRY-872(Array Biopharma)。

[0158] 在另一个优选实施方案中,组合疗法可以包括本发明的抗NGF抗体组合物与至少一种或多种蛋白质激酶C(PKC)抑制剂(例如拮抗PKC活性的化合物)。

[0159] 本发明的药物组合物的无菌可注射制剂可以通过下述进行制备：掺入活性化合物与根据需要的上文列举的成分之一或组合(例如缓冲液、赋形剂等)，随后为无菌微量过滤。一般地，通过将活性化合物掺入无菌媒介物内制备分散体，所述无菌媒介物含有基本分散介质和来自上文列举那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干)，其获得来自其先前无菌过滤溶液的活性成分加上任何另外所需成分的粉末。

[0160] 制剂可以方便地以单位剂型呈现，并且可以通过制药领域中已知的任何方法制备。如本文使用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗的受试者的单位剂量的物理不连续单位；每个单位含有计算为产生所需疗效的预定数量的活性化合物。

[0161] 在本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以这样改变，以便获得活性成分的量，其有效实现用于特定患者、组合物和施用方式的所需治疗应答，而对于患者是无毒的。选择剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因素，包括采用的本发明的具体组合物，或其酯、盐或酰胺的活性，施用途径，施用时间、待采用的具体化合物的排泄速率，治疗持续时间，与采用的具体化合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料，待治疗的患者的年龄、性别、重量、状况、一般健康和先前医疗史，和医学领域中众所周知的相似因素。具有本领域普通技术的医生或兽医可以容易地决定且开出有效量的所需药物组合物。例如，医生或兽医可以以低于为了实现所需疗效需要的水平开始在药物组合物中采用的本发明的化合物的剂量，并且逐步增加剂量直到实现所需效应。一般而言，本发明的组合物的合适日剂量将是有效产生疗效的最低剂量的化合物的那个量。此类有效剂量一般取决于上文描述的因素。

[0162] 在一个实施方案中，本发明的组合物的有效量是抑制患有其中 NGF 活性是有害的病症的受试者中的 NGF 活性的量。在一个实施方案中，组合物提供每次抗体的注射 100 mg 的有效剂量。在另一个实施方案中，组合物提供范围为约 0.1 - 约 100 mg 抗体的有效剂量。需要时，药物组合物的有效日剂量可以作为全天以合适间隔分开施用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量施用，任选以单位剂量形式。

[0163] 在本发明的一个实施方案中，在组合物中的抗体剂量是约 5 - 约 150 mg。在另一个实施方案中，在组合物中的抗体剂量是约 25 - 约 100 mg。在另一个实施方案中，在组合物中的抗体剂量是约 40 - 约 80 mg。在另一个实施方案中，在组合物中的抗体剂量是约 50 - 约 100 mg。在另一个实施方案中，在组合物中的抗体剂量是约 0.1 - 约 100 mg、约 0.5 - 75 mg、约 1.0 - 60 mg、约 5 - 40 mg、约 10 - 30 mg 或约 10 - 20 mg。组合物尤其适合于超过 10 mg 的大抗体剂量。在本发明的特定实施方案中，组合物提供约 10 mg 或约 20 mg 剂量的抗体。在另一个实施方案中，组合物提供约 80 mg 或约 100 mg 剂量的抗体。

[0164] 在本发明的一个实施方案中，在组合物中的抗体剂量是约 0.1 - 约 150 mg、1 - 约 150 mg、约 5 - 约 145 mg、约 10 - 约 140 mg、约 15-135 mg、约 20 - 约 130 mg、约 25 - 约 125 mg、约 30 - 约 120 mg、约 35 - 约 115 mg、约 40 - 约 110 mg、约 45 - 约 105 mg、约 50 - 约 100 mg、约 55 - 约 95 mg、约 60 - 约 90 mg、约 65 - 约 85 mg、约 70 - 约 80 mg 或约 75 mg。在一个实施方案中，抗体的剂量是 10 mg。在一个实施方案中，抗体的剂量是 20 mg。对于上述剂量中间的范围例如约 2 - 约 149 mg 也预期是本发明的部分。例如，预期包括使用任何上述值的组合作为上和/或下限的值范围。

[0165] 对于特定施用途径，可以选择合适的递送设备用于使用。例如，对于皮下或肌内施用，可以使用注射笔(例如可以自施用)。此类注射笔也称为注入器是本领域已知的，包括含有抗体的液体剂量的那些(例如 PCT 公开 WO 2008/005315 中所述的那种)。另外对于皮下施用，可以使用皮下植入物。另外，经皮递送可以通过使用局部皮肤的(皮肤)贴剂(例如胶粘贴剂)实现。经皮递送还可以通过干粉注射(例如从 Glide Pharma 商购可得的注入器)来实现。再进一步地，对于递送到肺内(例如在哮喘或顽固性咳嗽的治疗中)，可以采用例如通过使用吸入器或喷雾器和具有气溶胶化试剂的组合物的肺施用。参见例如，美国专利号 6,019,968 ;5,985,320 ;5,985,309 ;5,934,272 ;5,874,064 ;5,855,913 ;5,290,540 ; 和 4,880,078 ;以及 PCT 公开号 WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346 和 WO 99/66903。

[0166] 在优选实施方案中，本发明的治疗组合物可以用无针皮下注射装置进行施用，例如公开于美国专利号 5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824 或 4,596,556 中的装置。在本发明中有用的众所周知的植入物和模块的例子包括 :公开可植入的微量输液泵用于以控制速率分配药物的美国专利号 4,487,603 ;公开用于通过皮肤施用药物的治疗装置的美国专利号 4.,486,194 ;公开用于以精确输注率递送药物的药物输注泵的美国专利号 4,447,233 ;公开变速流可植入输液器用于连续药物递送的美国专利号 4,447,224 ;公开具有多室区室的渗透药物递送系统的美国专利号 4,439,196 ;和公开渗透药物递送系统的美国专利号 4,475,196。许多其他此类植入物、递送系统和模块是本领域技术人员已知的。

[0167] 在特定实施方案中，本发明的药物组合物可以进一步配制以确保在体内的合适分布。例如，血脑屏障(BBB)排除许多高度亲水的化合物。为了确保本发明的治疗化合物跨越 BBB (需要时)，它们可以例如在脂质体中配制。对于制造脂质体的方法，参见例如，美国专利 4,522,811 ;5,374,548 ;和 5,399,331。脂质体可以包含一个或多个部分，其选择性转运到特定细胞或器官内，从而增强靶向药物递送(参见例如，V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685)。示例性靶向部分包括叶酸盐或生物素(参见例如，授予 Low 等人的美国专利 5,416,016) ;甘露糖苷(Umezawa 等人，(1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038) ;抗体(P.G. Bloeman 等人(1995) *FEBS Lett.* 357:140 ;M. Owais 等人(1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180) ;表面活性剂蛋白 A 受体(Briscoe 等人(1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134)，其不同种类可以包含本发明的制剂，以及发明的分子的组分 ;p120 (Schreier 等人(1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090) ;还参见 K. Keinanen ;M.L. Laukkanen(1994) *FEBS Lett.* 346:123 ;J.J. Killion ;I.J. Fidler(1994) *Immunomethods* 4:273。

[0168] 调整剂量方案以提供最佳所需应答(例如治疗应答)。例如，可以施用单次推注，可以随着时间过去施用几个分份剂量，或可以如通过治疗情况的紧迫指示按比例减少或增加剂量。一般的单次剂量(其可以在如下文进一步描述的给药方案上施用)可以范围为约 0.1 μg/kg - 1 μg/kg - 3 μg/kg - 30 μg/kg - 300 μg/kg - 3000 μg/kg(3 mg/kg)、-30 mg/kg - 100 mg/kg 或更多中的任何，取决于本文描述的因素。例如，抗 NGF 抗体可以以约 1 μg/kg、约 10 μg/kg、约 20 μg/kg、约 50 μg/kg、约 100 μg/kg、约 200 μg/kg、约 300 μg/kg、约 400 μg/kg 约 500 μg/kg、约 1 mg/kg、约 2 mg/kg 或约 3 mg/kg 施用。在

优选实施方案中，抗NGF抗体以范围为约3 μg/kg - 约3000 μg/kg的剂量施用。在另一个优选实施方案中，抗NGF抗体以100 μg/kg的剂量施用。在另一个优选实施方案中，抗NGF抗体以200 μg/kg的剂量施用。在另一个优选实施方案中，抗NGF抗体以300 μg/kg的剂量施用。在另一个优选实施方案中，抗NGF抗体以400 μg/kg的剂量施用。

[0169] 对于在几天、周或月或更久内反复施用，取决于状况，治疗持续直至出现所需的症状抑制或直至实现足够的治疗水平(例如以减少疼痛)。示例性给药方案包含施用以约3 μg/kg - 500 μg/kg范围中的初始剂量，随后为约3 μg/kg - 500 μg/kg的抗NGF抗体的每月维持剂量。在另一个实施方案中，每个月一次施用约200 μg/kg的剂量。在另外一个实施方案中，每两个月一次施用约400 μg/kg的剂量。然而，其他剂量方案可以是有用的，取决于从业者希望实现的药物代谢动力学衰变的模式。例如，在一些实施方案中，考虑从每周一次到四次的给药。然而，考虑到通过抗NGF抗体的疼痛减轻的长持续时间，可以使用更不频繁的给药。在一些实施方案中，抗NGF抗体施用每周一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次、每8周一次、每9周一次、每10周一次、每15周一次、每20周一次、每25周一次、每26周一次或更久。在一些实施方案中、抗NGF抗体施用每1个月一次、每2个月一次、每3个月一次、每4个月一次、每5个月一次、每6个月一次或更久。

[0170] 在优选实施方案中，抗NGF抗体是PG110抗体或其抗原结合片段，并且以在0.1 mg/kg - 0.2 mg/kg的范围中、优选0.15 mg/kg的剂量静脉内施用(例如对于人)，每12周一次。在另一个优选实施方案中，抗NGF抗体以在0.2 mg/kg - 0.4 mg/kg的范围中、优选0.3 mg/kg的剂量皮下施用(例如对于人)，每十二周一次。在另外其他实施方案中，PG110或其片段以在0.1 mg/kg - 3 mg/kg的范围中、或在0.1 mg/kg - 30 mg/kg的范围中、或在0.1 mg/kg - 20 mg/kg的范围中、或在0.1 mg/kg - 10 mg/kg的范围中、或在1 mg/kg - 30 mg/kg的范围中、或在1 mg/kg - 20 mg/kg的范围中或在1 mg/kg - 10 mg/kg的范围中的剂量施用。

[0171] 以剂量单位形式配制肠胃外组合物用于容易施用和剂量的均匀性是尤其有利的。如本文使用的单位剂量形式指适合作为用于待治疗的受试者的单位剂量的物理不连续单位；每个单位含有与所需药物载体结合的计算为产生所需疗效的预定数量的活性化合物。用于本发明的剂量单位形式的规格通过下述指示且直接依赖于下述：(a)活性化合物的独特特征和待实现的具体疗效，和(b)配药法领域中固有的局限性例如用于治疗个体中的敏感性的活性化合物。例如，剂量单位形式的非限制性例子包括0.2 mg(对应于在约70 kg的个人中3 μg/kg的剂量)、2 mg(对应于在约70 kg的个人中30 μg/kg的剂量)和7 mg(对应于在约70 kg的个人中100 μg/kg的剂量)。

[0172] V. 使用方法

本发明提供了具有延长半衰期的稳定、高浓度组合物，其在一个实施方案中用于抑制患有其中NGF活性是有害的病症的受试者中的NGF活性。该方法一般包括给受试者施用本发明的组合物，从而使得受试者中的NGF活性是减少或抑制的。优选地，NGF是人NGF，并且受试者是人受试者。可替代地，受试者可以是表达本发明的抗体与之交叉反应的NGF的哺乳动物。再进一步地，受试者可以是已引入hNGF(例如通过hNGF的施用或通过hNGF转基因的表达)的哺乳动物。此外，本发明的组合物可以施用于表达抗体与之交叉反应的NGF的

非人哺乳动物(例如灵长类动物、猪或小鼠)用于兽医学目的或作为人疾病的动物模型。关于后者,此类动物模型可以用于评估本发明的抗体的疗效(例如测试施用剂量和时程)。

[0173] 本发明的组合物可以施用于人受试者用于治疗或预防目的。相应地,在另一个方面,本发明提供了治疗例如减弱或抑制受试者中的 NGF 相关疾病或状况的方法,该方法包括给受试者施用本发明的药物组合物。优选地,抗 NGF 抗体用于减弱或减轻疼痛,例如与其中疼痛的发展或维持至少部分通过 NGF 介导的疾病或状况相关的疼痛。NGF 相关疾病或状况的非限制性例子包括炎性痛,手术后疼痛,术后疼痛(包括牙痛),神经性疼痛,周围神经病,糖尿病性神经病,骨折痛,痛风关节疼痛,疱疹后神经痛,癌症疼痛,骨关节炎或类风湿性关节炎疼痛,坐骨神经痛,与镰状细胞危象相关的疼痛,头痛(例如偏头痛、紧张性头痛、丛集性头痛),痛经,子宫内膜异位症,子宫肌瘤,肌肉骨骼痛,慢性腰背痛,纤维肌痛,扭伤,内脏痛,卵巢囊肿,前列腺炎,慢性骨盆痛综合征,膀胱炎,间质性膀胱炎,膀胱疼痛综合征和 / 或膀胱痛综合征,与慢性非细菌性前列腺炎相关的疼痛,切口痛,偏头痛,三叉神经痛,来自烧伤和 / 或伤口的疼痛,与创伤相关的疼痛,与肌肉骨骼疾病相关的疼痛,强直性脊柱炎,关节周病理状态,来自骨转移灶的疼痛,来自 HIV 的疼痛,红斑性肢痛病或由胰腺炎或肾结石引起的疼痛,恶性黑素瘤,Sjogren's 综合征,哮喘(例如伴随严重气道高反应性的不受控制的哮喘),顽固性咳嗽,脱髓鞘疾病,慢性酒精中毒,中风,丘脑痛综合征,来自毒素的疼痛,来自化学疗法的疼痛,纤维肌痛,炎性肠病,肠易激综合征,炎症眼病症,炎症或不稳定膀胱病症,银屑病,具有炎症组分的皮肤主诉,晒伤,心炎,皮炎,肌炎,神经炎,胶原血管疾病,慢性炎性状况,炎性痛和相关痛觉过敏和异常性疼痛,神经性疼痛和相关痛觉过敏或异常性疼痛,糖尿病性神经病,皮肤灼痛,交感维持性疼痛,去传入综合征,上皮组织损伤或功能障碍,在呼吸、泌尿生殖、胃肠道或脉管区域的内脏能动性紊乱,变应性皮肤反应,瘙痒(pruritis),白癜风,一般胃肠道病症,结肠炎,胃溃疡,十二指肠溃疡,血管运动性或变应性鼻炎,支气管病症,消化不良,胃食管反流,胰腺炎和内脏痛。

[0174] 此外,NGF 已牵涉癌症例如前列腺癌、甲状腺癌、肺癌、催乳素瘤和黑素瘤的增殖。相应地,在另一个实施方案中,可以使用本发明的药物组合物治疗的 NGF 相关疾病或状况是癌症,例如前列腺癌、甲状腺癌、肺癌、催乳素瘤或黑素瘤。因此,在另一个实施方案中,本发明还提供了治疗受试者中的癌症的方法,优选前列腺癌、甲状腺癌、肺癌、催乳素瘤或黑素瘤,所述方法包括给受试者施用本发明的药物组合物。

[0175] 再进一步地,在另一个实施方案中,NGF 相关疾病或状况可以是 HIV/AIDS。使用本发明的抗 NGF 抗体的 NGF 阻断可以阻断 HIV 受感染的巨噬细胞,从而治疗 HIV/AIDS。相应地,在另一个实施方案中,本发明还提供了治疗受试者中的 HIV/AIDS 的方法,其包括给受试者施用本发明的药物组合物。

[0176] 用于根据本发明的方法治疗的特别优选的疾病和状况包括炎性痛(特别是骨关节炎或类风湿性关节炎疼痛)、肌肉骨骼痛(特别是慢性腰背痛)、癌症疼痛、神经性疼痛(特别是糖尿病性神经病疼痛)、来自骨转移灶的疼痛、间质性膀胱炎 / 膀胱疼痛综合征、与慢性非细菌性前列腺炎相关的疼痛、来自子宫内膜异位症和 / 或子宫纤维瘤的疼痛和术后疼痛。

[0177] 与子宫内膜异位症和 / 或子宫纤维瘤相关的疼痛和 / 或其他症状可以包含痛经 ;慢性非月经性骨盆痛 ;性交困难 ;大便困难(dyschexia) ;月经过多 ;小腹痛或背痛 ;不孕和生育力低下 ;排尿困难 ;胃气胀和排尿时疼痛 ;恶心、呕吐和 / 或腹泻(diarrohea)。症

状还可以包含与子宫内膜异位损伤有关的症状或位于腹腔外的纤维瘤，包括例如表现为咳血、气胸或血胸的胸内子宫内膜异位综合征，和表现为呼吸困难和肺肿块的肺平滑肌瘤(leiomyosis)。

[0178] 在特定优选实施方案中，本发明的药物组合物用于治疗疼痛。优选地，待治疗的疼痛类型选自骨关节炎疼痛、慢性腰背痛、糖尿病性神经性疼痛、癌症疼痛和子宫内膜异位症和/或子宫纤维瘤疼痛。相应地，在优选实施方案中，本发明提供了治疗受试者中的疼痛的方法，其包括施用本发明的药物组合物，从而受试者中的疼痛得以治疗。优选地，疼痛选自骨关节炎疼痛、慢性腰背痛、糖尿病性神经性疼痛、癌症疼痛和子宫内膜异位症和/或子宫纤维瘤疼痛。相应地，在一个实施方案中，本发明提供了治疗受试者中的骨关节炎疼痛的方法，其包括施用本发明的药物组合物，从而使得治疗受试者中的骨关节炎疼痛。在另一个实施方案中，本发明提供了治疗受试者中的慢性腰背痛的方法，其包括施用本发明的药物组合物，从而使得治疗受试者中的慢性腰背痛。在另外一个实施方案中，本发明提供了治疗受试者中的糖尿病性神经性疼痛的方法，其包括施用本发明的药物组合物，从而使得治疗受试者中的糖尿病性神经性疼痛。在另外一个实施方案中，本发明提供了治疗受试者中的癌症疼痛的方法，其包括施用本发明的药物组合物，从而使得治疗受试者中的癌症疼痛。在另外一个实施方案中，本发明提供了治疗受试者中的子宫内膜异位症和/或子宫纤维瘤疼痛的方法，其包括施用本发明的药物组合物，从而使得治疗受试者中的子宫内膜异位症和/或子宫纤维瘤疼痛。

[0179] 在优选实施方案中，本发明的药物组合物包括包含人IgG4恒定区的抗NGF抗体，所述人IgG4恒定区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列，并且长持续时间减轻抗体施用于其的受试者中的疼痛。例如，在一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约一周到约十二周(或至少一周到十二周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约一周(或至少一周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约两周(或至少两周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约四周(或至少四周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约八周(或至少八周)的持续时间。在另一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约十二周(或至少十二周)的持续时间。在一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约四周到约十二周(或四周到十二周)的持续时间。在一个实施方案中，在单次剂量的抗NGF抗体施用于受试者后，抗体减轻疼痛至少约八周到约十二周(或八周到十二周)的持续时间。

[0180] 在另一个实施方案中，本发明的药物组合物连同第二种药物试剂或第二个治疗方案一起施用。抗体和第二种试剂、或抗体和第二个治疗方案，可以同时施用或执行，或可替代地，可以首先施用抗体，随后为第二种药物试剂或第二个方案，或可以首先施用或执行第二种药物试剂或方案，随后为抗体。合适的第二种药物试剂和第二个治疗方案的非限制性例子在上文关于药物组合物的节段中阐述。用于与本发明的抗体组合使用的特别提及的第二种药物试剂是阿片类镇痛药。用于与本发明的抗体组合使用的其他优选的第二种药物试剂是TrkA抑制剂(例如细胞外TrkA抑制剂或细胞内TrkA抑制剂，如关于药物组合物的节

段中详细描述的）和蛋白质激酶 C（PKC）抑制剂。

[0181] 在另外一个方面，本发明提供了减弱或抑制受试者中的神经生长因子（NGF）相关疾病或状况的方法，从而使得回弹作用在受试者中被避免，该方法包括给受试者施用包括包含人 IgG4 恒定区的抗 NGF 抗体的本发明的药物组合物，其中所述人 IgG4 恒定区包含突变（优选铰链区突变），并且其中所述抗体在食蟹猴中具有至少 15 天的终末消除半衰期。在另一个实施方案中，抗体在食蟹猴中具有在约 15 天 - 约 22 天的范围中（或在 15-22 天的范围中）、或在约 15 天 - 约 28 天的范围中（或在 15-28 天的范围中）、或在约 21 天 - 约 28 天的范围中（或在 21-28 天的范围中）的终末消除半衰期。在另一个实施方案中，抗体在大鼠中具有至少 8 天的终末消除半衰期。在另外一个实施方案中，抗体在人中具有至少 10-30 天（或至少 10 天、至少 15 天、至少 20 天、至少 25 天、至少 30 天、至少 40 天、或在约 10 天 - 约 40 天的范围中或在 10-40 天的范围中、或在约 15 - 约 30 天的范围中或在 15-30 天的范围中）的平均终末消除半衰期。优选突变包括在上文中详细描述的那些。优选的抗体包括该序列和 / 或具有在上文中详细描述的功能性质的抗 NGF 抗体。

[0182] VI. 制品

还在本发明的范围内是包含本发明的液体药物组合物的自动注射笔、预装注射器或无针施用装置。在一个实施方案中，本发明的特征在于包含组合物的剂量的递送装置，所述组合物包含 100 mg/mL 的抗人 NGF 抗体，或其抗原结合部分，例如自动注射笔或预装注射器包含约 1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg、16 mg、17 mg、18 mg、19 mg、20、mg、21 mg、22 mg、23 mg、24 mg、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、31 mg、32 mg、33 mg、34 mg、35 mg、36 mg、37 mg、38 mg、39 mg、40 mg、41 mg、42 mg、43 mg、44 mg、45 mg、46 mg、47 mg、48 mg、49 mg、50 mg、51 mg、52 mg、53 mg、54 mg、55 mg、56 mg、57 mg、58 mg、59 mg、60 mg、61 mg、62 mg、63 mg、64 mg、65 mg、66 mg、67 mg、68 mg、69 mg、70 mg、71 mg、72 mg、73 mg、74 mg、75 mg、76 mg、77 mg、78 mg、79 mg、80 mg、81 mg、82 mg、83 mg、84 mg、85 mg、86 mg、87 mg、88 mg、89 mg、90 mg、91 mg、92 mg、93 mg、94 mg、95 mg、96 mg、97 mg、98 mg、99 mg、100 mg、101 mg、102 mg、103 mg、104 mg 或 105 mg 的组合物的剂量。

[0183] 还在本发明的范围内的是包含以液体或冻干形式的本发明的药物组合物的试剂盒，且其任选包括用于在治疗 NGF 相关疾病或状况中使用的说明书。试剂盒可以包括指示试剂盒的内容物的预期用途的标签。术语标签包括在试剂盒上或与试剂盒一起供应，或另外伴随试剂盒的任何书面、销售材料或记录的材料。

[0184] 例如，本发明还提供了在试剂盒或制品内包装的本发明的包装药物组合物。本发明的试剂盒或制品含有对于治疗，包括受试者中 NGF 相关疾病或状况的预防、治疗和 / 或诊断有用的材料。在优选实施方案中，NGF 相关疾病或状况是炎性痛（特别是骨关节炎或类风湿性关节炎疼痛）、肌肉骨骼痛（特别是慢性腰背痛）、神经性疼痛（特别是糖尿病性神经病疼痛）、癌症疼痛（特别是来自骨转移灶的疼痛）、与子宫内膜异位症和 / 或子宫纤维瘤相关的疼痛和手术后疼痛。试剂盒或制品包含容器和在容器上或伴随容器的标签或药品说明书或印刷材料，其提供关于抗 NGF 抗体（例如 PG110）用于治疗本文描述的 NGF 相关疾病或状况的用途的信息。

[0185] 试剂盒或制品指包含与其一起施用本发明的药物组合物用于治疗 NGF 相关疾病

或状况的组分的包装产品。试剂盒优选包含容纳试剂盒的组分的盒或容器，并且还可以包括用于施用药物组合物的方案和 / 或“药品说明书”。盒或容器容纳本发明的组分，其优选包含在塑料、聚乙烯、聚丙烯、乙烯或丙烯容器内。例如，用于本发明的药物组合物的合适容器包括例如瓶、小瓶、注射器、笔等。

[0186] 术语“药品说明书(package insert)”用于指照例包括在治疗产品的商业包装中的说明书，其含有关于涉及此类治疗产品的使用的适应症、用量、剂量、施用、禁忌和 / 或警告的信息。在一个实施方案中，本发明的药品说明书通知将施用本发明的药物组合物用于治疗的读者包括受试者例如购买者，本发明的药物组合物指示用于治疗如本文描述的 NGF 相关疾病或状况。在一个实施方案中，药品说明书描述本发明的药物组合物的特定治疗利益，包括疼痛的减轻。在另一个实施方案中，药品说明书可以包括在本发明的药物组合物中的抗 NGF 剂量的描述。在另一个实施方案中，药品说明书可以包括本发明的药物组合物的施用途径和频率的描述。在另一个实施方案中，本发明的药品说明书还可以给接受本发明的药物组合物的受试者提供关于安全和功效目的的组合用途的信息。例如，在特定实施方案中，试剂盒进一步包含第二种药物组合物，其包含与关于施用两种试剂用于治疗 NGF 有关疾病或状况的说明书一起包装或共促进(copromoted)的另外治疗剂。关于使用本发明的试剂盒治疗的特别优选的疾病和状况包括炎性痛(特别是骨关节炎或类风湿性关节炎疼痛)、肌肉骨骼痛(特别是慢性腰背痛)、神经性疼痛(特别是糖尿病性神经病)、癌症疼痛和来自骨转移灶的疼痛、与子宫内膜异位症和 / 或子宫纤维瘤相关的疼痛和手术后疼痛。

[0187] 本发明的其他实施方案在下述实施例中描述，其不应解释为进一步限制性的。序列表、附图和所有参考文献，贯穿本申请引用的专利和公开的专利申请的内容特别引入本文作为参考。

实施例

[0188] 下文呈现的实施例详述执行的实验，以检查溶液 pH、冻融、PG110 蛋白质浓度和多种缓冲液和赋形剂对 PG110 的物理和化学稳定性的作用，以便开发 PG110 的合适制剂。

[0189] 下述分析方法在执行的实验中使用，以评估且监控 PG110 在溶液中的稳定性。

[0190] *一般方法*

测试 PG110 制剂的一般质量参数(例如 pH)、物理稳定性的参数(例如澄清度、颜色、粒子污染和纯度)、和化学稳定性的参数、脱酰胺、氧化、一般化学稳定性和尺寸排阻层析(SEC)。示例性测试包括用于可见微粒污染的测试、用于亚可见粒子的光掩蔽粒子计数测试、和用于纯度的测试例如尺寸排阻 HPLC 和图像毛细管等电聚焦。

[0191] 微粒污染(例如可见粒子)通过目视检查进行测定。亚可见粒子根据美国药典(USP)通过光阻法进行监控。此外，制剂的物理化学稳定性通过 SEC 估计，所述 SEC 允许检测片段和聚集体。

[0192] 为了监控化学稳定性，执行尺寸排阻高压液相层析(SE-HPLC)(用于检测制剂样品中的片段和水解)和 icIEF (图像毛细管等电聚焦)。

[0193] *icIEF 方法*

icIEF 分析使用具有 PrinCE 自动采样器(Covergent Biosciences)的 iCE280 成像 cIEF 系统执行。下表 1 列出用于 icIEF 分析的试剂和材料。

[0194] 表 1

试剂	制造商	产品 ID
1% 甲基纤维素溶液	ConvergentBioscience	101876
0.5% 甲基纤维素溶液	ConvergentBioscience	102505
Pharmalyte3-10	GEhealthcare	17-0456-01
0.08MH3PO4 的 0.1% 甲基纤维素溶液(阳极电解液)	ConvergentBioscience	102506
0.1MNaOH 的 0.1% 甲基纤维素溶液(阴极电解液)	ConvergentBioscience	102506
pI5.12 标记	ConvergentBioscience	102224
pI9.22 标记	ConvergentBioscience	102231

[0195] 根据制造商说明书操作 iCE280 仪器。将各自小瓶填充新鲜的阳极电解液和阴极电解液溶液,将废物小瓶填充 MilliQ HPLC 水,并且打开 UV 灯。

[0196] 通过用 MilliQ HPLC 水将 pI 5.12 和 pI 9.22 标记稀释 10 倍,并且充分混合来制备 pI 标记。

[0197] 通过用 MilliQ HPLC 水将 PG110 测试样品稀释至 1 mg/mL,将稀释的抗体溶液与下表中的组分组合,并且轻轻涡旋,制备用于分析的 PG110 样品。随后将样品转移至在自动采样器管中固定的玻璃插入物,并且在置于 PrinCE 自动采样器内之前脱气 5 分钟。

[0198] 表 2

组分	体积(μL)
1% 甲基纤维素	70
Pharmalyte3-10	8
稀释的 pI5.12 标记	8
稀释的 pI9.22 标记	8
1mg/mL 样品	50
水	56

[0199] *尺寸排阻 HPLC 方法*

尺寸排阻 HPLC 用于测定 PG110 溶液的纯度。测定如下概述执行。

[0200] 将 TSK 保护凝胶(gel guard)(目录号 08543,6.0 mm x 4.0 cm,7 μm)与 TSK 凝胶 G3000SW (目录号 08541,7.8 mm x 30 cm,5 μm)组合,并且用 70 巴的柱压上限运行。流动相由 100 mM Na_2HPO_4 / 200 mM Na_2SO_4, pH 7.0 组成。通过将 49.68 g 无水磷酸氢二钠和 99.44 g 无水硫酸钠溶解于约 3300 mL Milli-Q 水中,使用 1 M 磷酸将 pH 调整至 7.0,用 Milli-Q 水将缓冲体积增加至 3500 mL,并且通过膜滤器过滤溶液,产生这种缓冲液。

[0201] 实验参数如下 :

- 0.3 ml/ 分钟流速
- 20 μL 注射体积(等价于 20 μg 样品)
- 室温柱
- 2 - 8℃自动采样器温度
- 50 分钟运行时间
- 等度梯度。

[0202] 使用二极管阵列检测器执行检测,所述二极管阵列检测器使用 214 nm 波长(> 0.1 min 峰宽度和 8 nm 带宽)和 360 nm 参考波长(100 nm 带宽)。

[0203] 测试样品一式三份地注射。通过比较 PG110 抗体峰的面积与样品中的所有 214 nm 吸收组分的总面积测定纯度,排除缓冲液相关峰。使用这种方法从完整 PG110 中分辨出高

分子量聚集体和抗体片段。

[0204] *光遮蔽(Light obscuration assay)*

执行光遮蔽测定以测量抗体溶液的不溶性微粒含量。光遮蔽测量装备(粒子计数器，模型注射器，Klotz (Bad Liebenzell，德国，系列 S20037) 配备层流式空气罩(Thermo Electron Corp.，Asheville，NC，型号 ULT2586-9-A40)，以使在测量过程中的外来粒子污染降到最低。如下执行光遮蔽分析。在空气层流条件下将 3.5 mL 样品置于 5 mL 圆底管中。在最初 0.8 mL 清洗后，根据制造商的说明书以 n=3 模式(0.8 mL/ 单次测量) 执行测量。

[0205] *示差扫描量热法(DSC)*

在 DSC 分析前，使用 Slide-A-Lyzer Cassettes 将蛋白质透析到合适缓冲系统内。这种缓冲系统(10 mM 磷酸盐，10 mM 柠檬酸盐)也用作参考 / 空白用于 DSC 测量。抗体以 1-2 mg/mL 分析。使用具有 Capillary Cell (Microcal) DSC 仪器的自动化 VP-DSC。在 25℃ - 95℃温度范围应用 1℃ / 分钟扫描速率研究分子的解折叠。其他测量参数是 :配合期 (fitting period) :16 秒，扫描前等待 :10 分钟，反馈模式 :无。

[0206] *目视检查*

通过用肉眼小心地检查样品容器中的蛋白质溶液执行蛋白质样品的目视检查。一般地，样品针对白色和暗 / 黑色背景检查，以更容易地鉴定可见微粒物质、朦胧、乳光或蛋白质沉淀物和可见粒子和附聚物。顺应目视检查的样品容器可以改变，并且可以包括容器例如半透明和透明的 Falcon 管、玻璃小瓶、低容量小瓶 / 管、和 slide-a-lyzer 盒。

[0207] 实施例 1 :在反复冻 / 融研究(-80℃ /30℃) 过程中溶液 pH 对 PG110 制剂的稳定性的影响。

[0208] 通过在 pH 4、pH 5、pH 6、pH 7 和 pH 8 将蛋白质溶液在冷冻状态和液体状态之间循环最高 4 次，估计在 10 mM 柠檬酸盐 /10 mM 磷酸盐缓冲液中以 1 mg/mL 蛋白质浓度的 ABT110 抗体的冻融行为。借助于温度控制的 -80℃冰箱执行冷冻，并且借助于 30℃温度控制的水浴执行融化。在每个冻 / 融(F/T)循环后取出(pull)样品并且通过 SEC 分析。将约 20 mL 的每种 PG110 溶液置于 30 mL PETG 储库中用于这个实验。表 3 提供关于用于 SEC 的测试间隔时间和执行的冻 / 融循环数目的概述。表 4 显示冻 / 融处理对剩余的 PG110 单体量和在这些 pH 水平配制的样品中形成的片段和聚集体的量的作用。

[0209] 表 3 :测试间隔时间 :测试的冷冻(-80℃) 和融化(30℃水浴) 循环数目

	测试间隔时间：对于测试的冻/融循环数目和样品需求	
用于应激测试的贮存温度	T_0	4
-80℃/30℃循环研究	1	1

[0210] 表 4 :如经由 SEC 测定的，在反复冻 / 融循环过程中 PG110 的物理稳定性

单体

f/t 循环	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
T0	98.53	98.46	98.39	98.11	98.00
T4	96.74	96.46	97.81	97.91	97.55

聚集体

f/t 循环	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
T0	1.31	1.41	1.47	1.74	1.85
T4	3.00	3.34	2.00	1.94	2.24

片段

f/t 循环	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
T0	0.15	0.11	0.13	0.14	0.14
T4	0.24	0.18	0.18	0.13	0.19

[0211] 结果显示 PG110 单体的量在反复冻 / 融(F/T)处理过程中轻微减少,然而,仅为小程度,且超过 95% 的完整单体在溶液中保持稳定。

[0212] 进行光遮蔽实验,以测定在每个冻 / 融步骤过程中形成的亚可见粒子数目。表 5 提供关于用于光遮蔽的测试间隔时间和执行的冻 / 融循环数目的概述。表 6 和 7 分别显示冻 / 融处理对尺寸大于等于 1 微米 /mL 和大于等于 10 微米的粒子数目的作用。

[0213] 表 5 :测试间隔时间 :测试的冷冻(-80℃)和融化(30℃水浴)循环数目

	测试间隔时间:对于测试的冻/融循环数目和样品需求	
用于应激测试的贮存温度	T_0	3
-80℃/30℃循环研究	2	2

[0214] 表 6 :如通过光遮蔽技术经由亚可见粒子测量测定的,在反复冻 / 融循环过程中 PG110 的物理稳定性。尺寸大于等于 1 微米 /mL 的粒子(数据代表两次测量的平均值)

	0F/T	与平均值的偏差	1F/T	与平均值的偏差	2F/T	与平均值的偏差	3F/T	与平均值的偏差
水 / 对照	15	3.75	30.41	7.5	19.37	4.79	29.37	9.79
pH4	3605	140	8576	7716	10524	1432	45162	2117
pH5	2150	1595	14793	1976	26302	8870	74402	9673
pH6	207	4.58	53577	6670	30601	4386	75999	10809
pH7	140	19	41932	4279	32737	50	54267	2828
pH8	137	1.25	18862	2643	21725	1407	48981	623

[0215] 表 7 :如通过光遮蔽技术经由亚可见粒子测量测定的,在反复冻 / 融循环过程中 PG110 的物理稳定性。尺寸大于等于 10 微米 /mL 的粒子(数据代表两次测量的平均值)

	0F/T	与平均值的偏差	1F/T	与平均值的偏差	2F/T	与平均值的偏差 e	3F/T	与平均值的偏差
水 / 对照	0	0	2.08	2.08	1.25	0	0.79	0.79
pH4	55.62	16	121	105	1375	147	3142	2789
pH5	41	31	744	390	9293	5575	20507	14028
pH6	5.62	0.62	993	253	3823	3.54	8039	1785
pH7	4.58	0.41	494	49	3932	21	6517	1167
pH8	4.79	1.45	301	244	4019	216	4063	735

[0216] 实施例 2 :在加速贮存过程中溶液 pH 对 PG110 制剂的物理化学稳定性的影响。

[0217] 在蛋白质液体和冻干制剂的加速 / 长期贮存过程中影响蛋白质稳定性的重要因素是制剂的 pH 和贮存温度。为了评估这些因素的影响,使蛋白质在配制前和配制计划阶段过程中在升高温度暴露于短期贮存,以便快速获得用于在更低温度(例如 2-8℃)的长期贮

存的配制可行性中的了解。

[0218] 在控制温度条件下延长时间段在多个温度估计PG110抗体在溶液(2 mg/mL,10 mM柠檬酸盐/10mM磷酸盐缓冲液)中的贮存稳定性。在限定贮存期后,取出样品并且估计贮存时间和贮存温度对PG110稳定性的影响。

[0219] 对于这个pH筛选研究,在pH 3、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7和pH 8,以在10 mM磷酸盐、10 mM柠檬酸盐中的2 mg/mL配制PG110。

[0220] 将样品填充到无菌小瓶(各约500 μL)内,并且在40℃和50℃在控制条件下(在温度室中和在不存在光的情况下)贮存。在预定时间点,根据表8中提供的样品取出方案取出制备溶液的样品用于分析。数目指贮存/取出的小瓶数目。所得到的数据在表9和表10中提供。

[0221] 表8:样品取出方案

	T0	7天	6m	12m
5℃			1	1
25℃			1	
40℃	1	1		
50℃		1		

[0222] 表9:当贮存于50℃时,在长期贮存(SEC数据)后,在多个pH配制的PG110样品的单体、聚集体和片段含量

贮存于50℃的PG110						
单体						
时间	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
0	0	96.85	97	97.15	96.93	96.68
7天	0	9.65	85.54	94.84	93.96	92.2
聚集体						
0	100.00	1.75	1.75	1.62	1.95	2.12
7天	100.00	86.22	12.41	3.06	4.00	5.19
片段						
0	0.00	1.39	1.23	1.21	1.10	1.18
7天	0.00	4.12	2.03	2.08	2.03	2.60

[0223] 表10:当贮存于多个温度时,在长期贮存(SEC数据)后,在多个pH配制的PG110样品的单体、聚集体和片段含量

贮存于多个温度的 PG110						
单体						
时间	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
0	0	96.85	97	97.15	96.93	96.68
7 天，40C	0	81.64	96.64	96.84	96.1	95.49
6 个月，25C	0	92.89	94.81	94.32	95.14	89.12
6 个月，5C	0	97.87	97.86	97.78	97.33	97.10
12 个月，5C	0	97.50	97.37	97.53	97.11	96.42
聚集体						
0	100	1.75	1.75	1.62	1.95	2.12
7 天，40C	100	15.32	1.78	1.65	2.56	3.08
6 个月，25C	100	2.55	2.38	3.02	2.71	2.81
6 个月，5C	100	1.38	1.56	1.64	1.95	2.22
12 个月，5C	100	1.40	1.62	1.57	2.04	2.67
片段						
0	0	1.39	1.23	1.21	1.1	1.18
7 天，40C	0	3.03	1.57	1.49	1.33	1.42
6 个月，25C	0	4.55	2.79	2.64	2.14	8.05
6 个月，5C	0	0.73	0.57	0.56	0.71	0.66
12 个月，5C	0	1.08	1.00	0.88	0.83	0.90

[0224] 还估计用于上文提及的加速稳定性样品的图像毛细管等电聚焦的数据。icIEF 提供关于分子的化学稳定性的信息。表 11 和 12 分别显示样品取出方案和数据。

[0225] 表 11 :样品取出方案

	T0	21 天	4 个月	12 个月
40℃	1	1	1	
25℃			1	
5℃			1	1

[0226] 表 12 :当贮存于多个温度时，在长期贮存(iCIEF)后，在多个 pH 配制的 PG110 样品的主要、酸性和碱性种类的含量。结果还显示分子的相应 pI。

T0				
样品	酸性	主要	碱性	pI
pH 4.0	33.27	55.38	11.35	7.01
pH 5.0	33.98	56.63	9.39	6.95
pH 6.0	32.57	57.13	10.3	7.01
pH 7.0	31.71	58.72	9.57	7.1
pH 8.0	31.98	59.03	8.99	7.12
40℃ 21 天				
	酸性	主要	碱性	pI
pH 4.0	24.87	23.81	51.33	6.94
pH 5.0	46.38	44.1	9.53	6.94
pH 6.0	48.31	43.42	8.27	6.94
pH 7.0	56.99	37.06	5.95	6.94
pH 8.0	74.27	19.43	6.3	6.93
5℃ 4 个月				
	酸性	主要	碱性	pI
pH 4.0	35.50	52.96	11.54	7.02
pH 5.0	33.43	56.73	9.84	7.01
pH 6.0	33.62	57.09	9.30	7.01
pH 7.0	34.56	56.49	8.95	7.01
pH 8.0	37.02	54.31	8.68	7.01
25℃ 4 个月				
	酸性	主要	碱性	pI
pH 4.0	52.31	29.10	18.59	7.01
pH 5.0	44.39	45.58	10.03	7.02
pH 6.0	43.76	47.81	8.43	7.01
pH 7.0	53.44	40.08	6.48	7.01
pH 8.0	70.80	26.00	3.20	6.99
40℃ 4 个月				
	酸性	主要	碱性	pI
pH 4.0	19.02	9.62	71.36	6.99
pH 5.0	74.96	7.37	17.68	7.01
pH 6.0	85.28	8.94	5.78	7.01
pH 7.0	95.74	4.26	0.00	6.98
pH 8.0	99.07	0.36	0.57	6.98
5℃ 12 个月				
	酸性	主要	碱性	pI
pH 4.0	37.21	52.58	10.21	7.17
pH 5.0	35.45	55.20	9.35	7.16
pH 6.0	34.95	55.48	9.57	7.14
pH 7.0	36.76	54.55	8.69	7.14
pH 8.0	42.54	49.29	8.17	7.12

[0227] 这些数据证实约 pH 5-7 的溶液 pH 范围在增加温度时最佳维持 PG110 稳定性。在 40℃和 50℃贮存 1 周后，单体水平在 pH 6 配制的样品中最高。

[0228] 在 pH 5-7 范围外以 2 mg/mL 的 PG110 明确诱导稳定性丧失，这通过增加水平的聚集体和片段反映。片段水平揭示在约 pH 6 配制的样品中最低限度的降解。icIEF 数据还显示约 6 的 pH 是以维持 PG110 的稳定性最佳的。这些数据暗示约 5.5 -6.5 的 pH 在这个实验中应用的特定应激条件下最佳维持 PG110 蛋白质稳定性。

[0229] 实施例 3：在 30 mg/mL 条件下在反复冻 / 融研究（-80℃ /30℃）过程中配方对 PG110 制剂的稳定性的影响。

[0230] 通过在 pH 5.5 将原料药在冷冻状态和液体状态之间循环最高 3 次，估计在不同配方中以 30 mg/mL 蛋白质浓度的 ABT110 抗体的冻融（F/T）行为。估计的配方是：

（1）10 mM 乙酸盐 + 125 mM 氯化钠 pH 5.5

（2）15 mM 组氨酸 pH 5.5

（3）15 mM 组氨酸和 0.01 % Tween 80 pH 5.5。

[0231] 借助于温度控制的 -80℃冰箱执行冷冻，并且借助于 30℃温度控制的水浴执行融化。在每个冻 / 融循环后取出（pull）样品并且通过 SEC 和目视检查分析。将约 1 mL 的 PG110 溶液置于储库中用于这个实验。表 13 提供关于用于 SEC 的测试间隔时间和执行的冻 / 融循环数目的概述。表 14 显示冻 / 融处理对剩余的 PG110 单体量和在这些 pH 水平配制的样品中形成的片段和聚集体的量的作用。

[0232] 表 13：测试间隔时间：测试的冷冻（-80℃）和融化（30℃水浴）循环数目

	测试间隔时间：对于测试的冻/融循环数目和样品需求	
用于应激测试的贮存温度	T_0	3
-80℃/30℃循环研究	1	1

[0233] 表 14：如经由 SEC 测定的，在反复冻 / 融循环过程中 PG110 的物理稳定性

乙酸盐+ NaCl pH 5.5				
单体	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	98.76	98.76	98.76	98.83
聚集体	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	1.23	1.23	1.23	1.16
片段	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	0	0	0	0
15 mM 组氨酸，pH 5.5				
单体	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	98.82	98.82	98.83	98.85
聚集体	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	1.17	1.17	1.16	1.14
片段	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	0	0	0	0
15 mM 组氨酸，0.01 % Tween 80，pH 5.5				
单体	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	98.85	98.85	98.89	98.86
聚集体	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	1.14	1.14	1.1	1.13
片段	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	0	0	0	0

[0234] 多种制剂的目视检查显示即使在 3 个 F/T 循环后，含有组氨酸和 tween 80（聚山梨醇酯 80）的制剂也具有最低限度的粒子形成，指示组氨酸和 Tween 80 是用于维持 PG110 稳定性的非常合适的赋形剂。另外两种试剂显示高得多数目的可见粒子（20-30 个可见粒子 / 容器）。

[0235] 实施例 4：在 1 mg/mL 条件下在微量热法研究（固有稳定性）过程中制剂参数对 PG110 制剂的稳定性的影响

通过使用微量热法估计在不同制剂中以 1 mg/mL 蛋白质浓度的 ABT110 抗体的热力学稳定性（固有稳定性）。加热以 1℃ / 分钟的扫描速率执行。结果概括于表 15 中。

[0236] 表 15：在不同配制条件下的解链转换温度。

	Tm1	Tm2	Tm3
15mM 组氨酸，pH6	58.59	67.25	75.02
15mM 磷酸盐，pH6	68.3	74.68	77.22
15mM 琥珀酸盐，pH6	68.4	74.62	77.09
10mM 乙酸盐 +125mMNaCl，pH5.5	65.5	72.99	76.21
水，pH6	69.82	75.58	77.81
10Mm 柠檬酸盐 +10mM 磷酸盐 +0.01%Tween80，pH6	67.8	73.96	76.69
10Mm 柠檬酸盐 +10mM 磷酸盐 +40mg/mL 甘露醇，pH6	68.5	74.52	77.2
10Mm 柠檬酸盐 +10mM 磷酸盐 +40mg/mL 山梨糖醇，pH6	68.9	74.9	77.34
10Mm 柠檬酸盐 +10mM 磷酸盐 +40mg/mL 蔗糖，pH6	68.75	74.73	77.41
10Mm 柠檬酸盐 +10mM 磷酸盐 +80mg/mL 海藻糖，pH6	68.9	74.91	77.55
10Mm 柠檬酸盐 +10mM 磷酸盐，pH4	53.68	62.02	69.68
10Mm 柠檬酸盐 +10mM 磷酸盐，pH6	67.92	74.41	76.78
10Mm 柠檬酸盐 +10mM 磷酸盐，pH8	70.56	75.58	77.42

[0237] 这些数据显示 PG110 的固有稳定性受制剂参数例如制剂 pH 和赋形剂影响。

[0238] 实施例 5 :在 100 mg/mL 条件下在反复冻 / 融研究(-80℃ /30℃)过程中浓度对 PG110 制剂的稳定性的影响。

[0239] 通过在 pH 6 将蛋白质溶液在冷冻状态和液体状态之间循环最高 4 次,估计以 100 mg/mL 蛋白质浓度的ABT110抗体的冻融(F/T)行为。先前数据指出组氨酸是用于稳定PG110的合适缓冲液 / 赋形剂,并且因此在 100 mg/mL 蛋白质浓度测试组氨酸对 PG110 蛋白质稳定性的稳定影响。

[0240] 借助于温度控制的 -80℃冰箱执行冷冻,并且借助于 30℃温度控制的水浴执行融化。在每个冻 / 融循环后取出(pull)样品并且通过 SEC 和目视检查分析。表 16 提供关于用于 SEC 的测试间隔时间和执行的冻 / 融循环数目的概述。表 17 显示冻 / 融处理对剩余的 PG110 单体量和在这些 pH 水平配制的样品中形成的片段和聚集体的量的作用。

[0241] 表 16 :测试间隔时间 :测试的冷冻(-80℃)和融化(30℃水浴)循环数目

	测试间隔时间:对于测试的冻/融循环数目和样品需求	
用于应激测试的贮存温度	T_0	1
-80℃/30℃循环研究	T2	2
-80℃/30℃循环研究	T4	2

[0242] 表 17 :如经由 SEC 测定的,在反复冻 / 融循环过程中,在 pH 6,15 mM 组氨酸中以高蛋白质浓度(100 mg/mL)配制的 PG110 的物理稳定性

SEC 数据	样品	T0	2 F/T	4F/T
单体	样品 1	98.0	97.9	97.9
	样品 2	-	97.9	97.9
聚集体	样品 1	1.9	1.9	1.9
	样品 2	-	1.9	1.9
片段	样品 1	0.1	0.2	0.2
	样品 2	-	0.2	0.2

[0243] 数据显示在 100 mg/mL 时,PG110 制剂在反复 f/t 处理过程中不经历物理不稳定性,因为单体、聚集体和片段水平贯穿 f/t 实验基本上保持未改变,指出组氨酸是用于在 f/t 处理过程中维持 PG110 稳定性的非常合适的赋形剂。

[0244] 实施例 6 :在如通过目视检查测定分析后,缓冲液和赋形剂对在PG110制剂内粒子的浊度和形态的影响

用PG110的早期经验已显示当贮存于pH 5.5的10 mM乙酸盐,125 mM NaCl溶液中时,如通过严重可见粒子形成和沉淀现象反映的,该蛋白质倾向于物理不稳定性。这个实验设计为验证可见粒子形成是否是该蛋白质自身固有的,或是否可以鉴定维持物理稳定性和减少粒子形成敏感性的制剂。

[0245] 因为可以用肉眼观察到上述粒子,所以用不同赋形剂配制的 PG110 溶液的小心目视检查是非常有益的方式,以测定何种配制条件可以加速或预防粒子形成。

[0246] 为了执行这点,通过透析制备具有表 18 中列出的赋形剂和以 1 mg/ml 浓度的 PG110 溶液。

[0247] 表 18 :估计其对溶液(通用缓冲液或 UB6 是 10 mM 磷酸盐,10 mM 柠檬酸盐 pH 6)

中的 PG110 可见粒子形成的作用的缓冲液和赋形剂。

- 15 mM 磷酸钠
- 15 mM 柠檬酸钠
- 15 mM 琥珀酸钠
- 15 mM 精氨酸
- 15 mM 组氨酸
- 自缓冲制剂
- 10 mM 通用缓冲液和 40 mg/mL 甘露醇
- 10 mM 通用缓冲液和 40 mg/mL 山梨糖醇
- 10 mM 通用缓冲液和 80 mg/mL 蔗糖
- 10 mM 通用缓冲液和 80 mg/mL 海藻糖
- 10 mM 通用缓冲液和 0.01%（m/m）聚山梨醇酯 80
- 10 mM 乙酸盐，125 mM NaCl。

[0248] 将大于 1 mg/ml 的 PG110 溶液插入具有 10,000 MWCO 的 slide-a-lyzer 盒内，并且针对 1 L 靶缓冲液 / 赋形剂介质透析 1 小时。然后，将透析介质替换为新鲜介质，并且透析继续过夜。在透析后，通过 UV280 测量溶液的浓度。如果浓度太高，那么用相应缓冲液将溶液稀释至靶浓度。如果浓度太低，那么用 Amicon Ultra 离心管将溶液浓缩至靶浓度。接下来，检查溶液的 pH。如果 pH 不在 6 的 ±0.1 内，那么用 0.1 M NaOH 或 0.1 M HCl 将 pH 调整至那个靶标。基于先前实验选择 pH 6 的条件，所述先前实验测定它接近用于化学和物理稳定性的最佳 pH。然后，将溶液经过 0.20 μm 滤器进入透明的 PETG 容器内。还将蒸馏水经过相同滤器进入 PETG 容器内，以充当对照。

[0249] 遵循这个程序，就粒子目视检查在 PETG 小瓶中的 PG110 溶液。针对软荧光以及针对黑色背景拿着瓶子。还将瓶子轻轻震荡以促使粒子流动，从而致使目视检查更容易。随后将瓶子贮存于 4℃过夜。第二天，从贮库中取出瓶子并且如上检查。

[0250] 在过滤后立即的检查揭示在所有样品中无可见粒子。然而，在 4℃贮存过夜后，目视检查揭示在许多缓冲液 / 赋形剂中的粒子形成。发现概括于表 19 中。

[0251] 表 19 :在列出的缓冲液 / 赋形剂中的 PG110 溶液的目视检查发现。在过滤和在 4℃贮存过夜后检查溶液。UB6 是 10 mM 柠檬酸盐，10 mM 磷酸盐 pH 6。

缓冲液 / 赋形剂	目视检查
水	无粒子
15mM 磷酸盐	尘样纤维
15mM 柠檬酸盐	尘样纤维
15mM 琥珀酸盐	许多尘样纤维
15mM 组氨酸	痕量尘样纤维
15mM 精氨酸	痕量尘样纤维
自缓冲 / 仅水	极少痕量尘样纤维
UB6+40mg/ml 山梨糖醇	尘样纤维
UB6+40mg/ml 甘露醇	痕量尘样纤维
UB6+80mg/ml 蔗糖	尘样纤维
UB6+80mg/ml 海藻糖	尘样纤维
UB6+0.01%Tween80	澄清的。无粒子
10mM 乙酸盐，125mMNaCl	许多尘样纤维

[0252] 数据指出 Tween-80 预防可见粒子形成，证明其用途。在具有在 pH 6 的缓冲能力

的给定赋形剂中(柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、组氨酸),数据指出组氨酸对于预防可见粒子形成是最佳的。

[0253] 实施例 7 :在反复冻 / 融循环(-80℃ /30℃)过程中缓冲液和配制赋形剂对 PG110 制剂的稳定性的影响。

[0254] 这个实施例描述进行的实验数据,以估计在反复冷冻(-80℃温度控制的冰箱)和融化(30℃温度控制的循环水浴)处理后,在以 2 mg/mL 和 pH 6 的 PG110 溶液的制剂中多种缓冲液和赋形剂的稳定潜力。(基于先前实验选择 pH 6 的条件,所述先前实验测定它接近用于化学和物理稳定性的最佳 pH)。测试的缓冲液和赋形剂在表 20 中列出。

[0255] 表 20 :当暴露于冻融(通用缓冲液或 UB6 是 10 mM 磷酸盐,10 mM 柠檬酸盐 pH 6)时,就其对 PG110 DS 降解的作用估计缓冲液和赋形剂。

- 15 mM 磷酸钠
- 15 mM 柠檬酸钠
- 15 mM 琥珀酸钠
- 15 mM 精氨酸
- 15 mM 组氨酸
- 低离子制剂(即在水中配制)
- 10 mM 通用缓冲液和 40 mg/mL 甘露醇
- 10 mM 通用缓冲液和 40 mg/mL 山梨糖醇
- 10 mM 通用缓冲液和 80 mg/mL 蔗糖
- 10 mM 通用缓冲液和 80 mg/mL 海藻糖
- 10 mM 通用缓冲液和 0.01% (m/m) 聚山梨醇酯 80
- 10 mM 乙酸盐,125 mM NaCl。

[0256] 在 T0、T1 (在一个冻 / 融步骤后)、T2 和 T3 时取出样品。一个冻 / 融处理步骤包含在 -80℃至少 4 小时的样品贮存,和样品在 30℃循环水浴中的后续解冻。为了分析冻融样品,用 3.5 mL 抗体制剂填充 5 mL 圆底管(使用 5 mL 吸管端,其已用 0.2 μm 过滤的 WFI 清洗),并且实施光遮蔽测量。此外,取出 0.1 mL 每种样品用于 SEC 分析,并且取出 0.2 mL 样品,并且贮存于 -80℃ (储备样品用于任选的另外分析表征)。

[0257] 表 21 :用于冻融实验的样品取出方案

	T0	T1	T2	T3	T4
-80℃ / 30℃	小瓶 1 小瓶 2	小瓶 1 小瓶 2	小瓶 1 小瓶 2	小瓶 1 小瓶 2	小瓶 1 小瓶 2

* 小瓶指示用样品溶液填充的 30 mL PETG 储库。

[0258] 在 PG110 的冻融处理过程中缓冲液和赋形剂对尺寸≥ 1 μm 和≥ 10 μm 的亚可见粒子形成的作用分别显示于表 22 和 23 中。SEC 数据在表 24、25 和 26 中给出。

[0259] 在一些制剂中,例如具有磷酸盐、柠檬酸盐、山梨糖醇、甘露醇和蔗糖的那些,≥ 1 μm/mL 的粒子数目在第一个冻融循环后增加,仅在第二个循环后减少。在其他制剂中,例如含有组氨酸、精氨酸或简单的水的那些,≥ 1 μm/mL 的粒子数目在每一个冻融循环后增加。对于具有磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、组氨酸、精氨酸和简单的水的制剂,≥ 10 μm/mL 的粒子在每一个冻融循环后增加。对于具有山梨糖醇、甘露醇或蔗糖的制剂,≥ 10 μm/mL 的

粒子在第一个冻融循环后增加，但随着后续循环减少。在一个冻融循环后，具有山梨糖醇或甘露醇的制剂具有最大数目的≥ 1 μm/mL（至少＞ ~200、000）以及≥ 10 μm/mL（~25000平均值)粒子。然而，在第三个冻融循环后，所有制剂都揭示小于 100,000/mL 的≥ 1 μm/mL 粒子。

[0260] 发现聚山梨醇酯 80 具有就维持 PG110 稳定性而言的正面效应，因为它预防在 PG110 的冻融处理过程中亚可见粒子的形成。这归于聚山梨醇酯 80 预防抗体在冰水界面处变性的能力。发现糖 / 糖醇包括甘露醇、山梨糖醇和蔗糖诱导在早期冻融循环后的亚可见粒子形成。这些观察得到 SEC 数据的支持，其显示对于具有甘露醇和山梨糖醇的制剂在 % 单体中的显著丧失和在 % 聚集体中的相应增加。(对于所有其他赋形剂，SEC 数据在稳定性方面没有区别)。

[0261] 表 22 :在列出的冻融循环后测量的≥ 1 μm/mL 粒子数目。F/T0 是在冷冻下。UB6 是 10 mM 磷酸盐，10 mM 柠檬酸盐 pH6。水是不含蛋白质的纯水。

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
	# >=1 um		# >=1 um		# >=1 um		# >=1 um	
缓冲液	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
磷酸盐	536.67	94.58	17274.58	6372.51	9415.42	2353.78	9014.58	512.36
柠檬酸盐	723.75	174.13	40620.83	795.79	27191.25	10421.87	10470.21	7553.08
琥珀酸盐	1147.29	571.58	20720.21	2263.33	19527.29	8585.45	9504.17	1297.25
组氨酸	250.21	42.43	1647.08	617.25	8963.33	4741.45	21077.50	12656.92
精氨酸	690.63	557.44	2407.29	122.57	5858.54	2044.13	8314.17	6856.28
自身/水	410.21	23.57	1622.50	811.11	8722.50	4459.19	21048.75	9602.80
UB6+山梨糖醇	1049.58	421.61	260052.29	31476.86	74827.29	21027.59	15613.54	10.02
UB6+甘露醇	1113.33	260.75	209047.71	40784.74	78368.54	9137.59	26725.21	4711.10
UB6+蔗糖	1330.00	169.41	43803.33	970.80	11592.08	408.65	7183.33	1182.34
UB6+海藻糖	1320.63	306.41	9674.17	1445.15	15516.25	1373.26	9259.17	7457.91
UB6+tween 80	11.04	7.66	671.67	707.40	185.83	219.50	231.46	139.65
10 mM 乙酸盐/ 125 mM NaCl	954.58	231.28	17396.67	617.83	14698.13	1752.45	10400.00	4.42
水	18.96		14.79		39.38		49.38	

[0262] 表 23. 在列出的冻融循环后测量的≥ 10 μm/mL 粒子数目。F/T0 是在冷冻下。UB6 是 10 mM 磷酸盐，10 mM 柠檬酸盐 pH6。水是不含蛋白质的纯水，低离子意指蛋白质在不添加另外的赋形剂的水中配制。

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
	# >=10 um		# >=10 um		# >=10 um		# >=10 um	
缓冲液	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
磷酸盐	18.54	6.19	248.33	55.68	574.79	435.17	1224.38	408.94
柠檬酸盐	26.67	12.37	533.96	383.61	968.75	192.10	899.17	217.14
琥珀酸盐	138.33	128.46	359.38	149.67	908.75	207.42	1920.21	121.98
组氨酸	36.25	22.98	73.33	58.04	4456.88	3766.82	6125.21	3906.76
精氨酸	167.29	213.61	59.79	43.02	1113.33	500.28	2978.54	3415.92
低离子	22.71	5.01	18.54	12.37	1871.88	2062.10	3028.33	2162.86
UB6+山梨糖醇	47.50	16.50	33930.83	12385.27	8329.79	2310.77	3302.50	1157.00
UB6+甘露醇	41.25	4.12	16219.17	18940.15	7868.13	1498.18	1774.17	969.03
UB6+蔗糖	43.33	1.77	3577.29	2615.12	2069.58	991.72	1427.92	1182.34
UB6+海藻糖	27.71	4.42	173.75	82.79	1866.04	27.99	379.17	310.24
UB6+tween 80	5.42	3.54	370.63	497.92	11.04	5.01	17.50	18.56
10 mM 乙酸盐/ 125 mM NaCl	124.79	78.08	241.67	16.20	584.38	93.40	930.21	390.68
水	2.08		1.04		0.00		1.04	

[0263] 表 24 :在冻 / 融实验过程中贮存后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的单体百分比(SEC 数据)(UB6 是 10 mM 柠檬酸盐,10 mM 磷酸盐 pH 6 ;“低离子”是仅在水中的蛋白质)。

	F/T0		F/T1		F/T2		F/T3	
缓冲液	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
磷酸盐	98.34	0.04	98.27	0.02	98.43	0.05	98.35	0.06
柠檬酸盐	98.42	0.03	98.04	0.36	98.43	0.05	98.33	0.11
琥珀酸盐	98.37	0.00	98.29	0.02	98.36	0.06	98.32	0.08
组氨酸	98.38	0.04	98.30	0.00	98.48	0.00	98.40	0.05
精氨酸	98.40	0.02	98.28	0.01	98.52	0.05	98.44	0.04
低离子	98.47	0.02	98.37	0.01	98.47	0.02	98.35	0.02
UB6+ 山梨糖醇	98.40	0.04	97.87	0.05	98.04	0.04	98.05	0.03
UB6+ 甘露醇	98.41	0.00	97.34	0.07	97.47	0.02	97.43	0.09
UB6+ 蔗糖	98.40	0.02	98.35	0.01	98.60	0.01	98.57	0.01
UB6+ 海藻糖	98.37	0.06	98.36	0.01	98.58	0.01	98.58	0.04
UB6+tween80	98.23	0.04	98.26	0.04	98.55	0.02	98.57	0.02
10mM 乙酸盐 /125mMNaCl	98.37	0.02	98.21	0.04	98.31	0.04	98.24	

[0264] 表 25 :在冻 / 融实验过程中贮存后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的聚集体百分比(SEC 数据)(UB6 是 10 mM 柠檬酸盐,10 mM 磷酸盐 pH 6 ;低离子意指蛋白质在不添加另外的赋形剂的水中配制)。

	F/T0		F/T1		F/T2		F/T3	
缓冲液	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
磷酸盐	1.49	0.02	1.56	0.02	1.36	0.03	1.41	0.05
柠檬酸盐	1.44	0.03	1.81	0.34	1.41	0.05	1.48	0.09
琥珀酸盐	1.48	0.01	1.55	0.02	1.42	0.06	1.43	0.07
组氨酸	1.46	0.03	1.52	0.00	1.30	0.01	1.32	0.04
精氨酸	1.44	0.02	1.54	0.00	1.27	0.04	1.29	0.03
低离子	1.37	0.00	1.45	0.01	1.29	0.02	1.36	0.01
UB6+ 山梨糖醇	1.47	0.04	1.98	0.04	1.77	0.04	1.74	0.03
UB6+ 甘露醇	1.45	0.00	2.50	0.05	2.33	0.03	2.37	0.09
UB6+ 蔗糖	1.46	0.01	1.48	0.01	1.23	0.01	1.23	0.02
UB6+ 海藻糖	1.48	0.06	1.48	0.01	1.22	0.01	1.22	0.03
UB6+tween80	1.61	0.04	1.56	0.04	1.24	0.00	1.21	0.01
10mM 乙酸盐 /125mMNaCl	1.46	0.02	1.60	0.04	1.44	0.04	1.49	

[0265] 表 26 :在冻 / 融实验过程中贮存后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的片段百分比(SEC 数据)(UB6 是 10 mM 柠檬酸盐,10 mM 磷酸盐 pH 6 ;低离子意指蛋白质在不添加另外的赋形剂的水中配制)。

	F/T0		F/T1		F/T2		F/T3	
缓冲液	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
磷酸盐	0.17	0.02	0.18	0.00	0.20	0.03	0.24	0.01
柠檬酸盐	0.14	0.00	0.15	0.02	0.17	0.00	0.20	0.01
琥珀酸盐	0.15	0.00	0.16	0.00	0.22	0.00	0.25	0.01
组氨酸	0.15	0.02	0.18	0.00	0.21	0.00	0.28	0.01
精氨酸	0.15	0.00	0.18	0.00	0.20	0.01	0.27	0.01
低离子	0.16	0.02	0.18	0.00	0.24	0.01	0.28	0.01
UB6+ 山梨糖醇	0.14	0.00	0.15	0.00	0.19	0.00	0.21	0.00
UB6+ 甘露醇	0.13	0.01	0.16	0.01	0.20	0.01	0.20	0.00
UB6+ 蔗糖	0.15	0.01	0.16	0.00	0.18	0.00	0.20	0.01
UB6+ 海藻糖	0.14	0.00	0.16	0.01	0.19	0.00	0.20	0.01

UB6+tween80	0.16	0.00	0.18	0.00	0.21	0.01	0.23	0.01
10mM 乙酸盐 /125mMNaCl	0.17	0.00	0.19	0.00	0.25	0.00	0.27	

[0266] 实施例 8 :在加速稳定性测试过程中缓冲液和赋形剂对 PG110 制剂的物理化学稳定性的影响。

[0267] 较早实施例已讨论在长期贮存过程中影响PG110 制剂的稳定性的因素,包括 pH 和贮存温度。除了这些外源性因素,制剂成分自身必须估计其对在贮存过程中的蛋白质原料药稳定性的影响。为了执行这点,使蛋白质原料药在配制前和配制计划阶段过程中在升高温度暴露于短期贮存,以便快速获得用于在更低温度(在大多数情况下 2-8℃)的长期贮存的配制可行性中的了解。

[0268] 在不同缓冲液和赋形剂中在 pH 6 在控制温度条件下延长时间段在多个温度估计 PG110 抗体在溶液中的贮存稳定性。基于先前实验选择 pH 6 的条件,所述先前实验测定它接近对于化学和物理稳定性的最佳 pH。在限定贮存期后,取出样品并且通过 SEC 和 iCIEF 估计贮存试剂和贮存温度对 PG110 稳定性的影响。

[0269] 在这个研究中,在表 27 中列出的多种缓冲液和赋形剂中以 2 mg/ml 配制 PG110。

[0270] 表 27. 就其对实施在升高温度的贮存的 PG110 物理和化学稳定性的作用测试缓冲液和赋形剂(通用缓冲液是 10 mM 柠檬酸盐,10 mM 磷酸盐 pH 6)

- 15 mM 磷酸钠
- 15 mM 柠檬酸钠
- 15 mM 琥珀酸钠
- 15 mM 乙酸钠
- 15 mM 精氨酸
- 15 mM 组氨酸
- 低离子制剂
- 10 mM 通用缓冲液和 40 mg/mL 甘露醇
- 10 mM 通用缓冲液和 40 mg/mL 山梨糖醇
- 10 mM 通用缓冲液和 80 mg/mL 蔗糖
- 10 mM 通用缓冲液和 80 mg/mL 海藻糖
- 10 mM 通用缓冲液和 2.5% (m/m) 甘油
- 10 mM 通用缓冲液和 15 mM 硫酸铵
- 10 mM 通用缓冲液和 20 mM 氯化钠
- 10 mM 通用缓冲液和 200 mM 氯化钠
- 10 mM 通用缓冲液和 0.01% (m/m) 聚山梨醇酯 80
- 10 mM 通用缓冲液和 0.01% (m/m) 聚山梨醇酯 20
- 10 mM 通用缓冲液和 0.1% (m/m) 泊洛沙姆 188。

[0271] 随后将样品贮存于在多种温度的控制条件下(在温度室中和在不存在光的情况下)。在预定时间点,对于 SEC 和 iCIEF,分别根据表 28 和 29 中提供的样品取出方案取出制备溶液的样品用于分析。数目指对于每种缓冲液或赋形剂条件贮存 / 取出的小瓶数目。数据在表 30、31 和 32 中提供。

[0272] 表 28 :样品取出方案

	T0	7 天	6 个月	12 个月
5℃				1
25℃			1	
40℃		1		
50℃	1	1		

[0273] 表 29 :样品取出方案

	T0	4 个月	12 个月
5℃		1	1
25℃		1	
40℃	1	1	

[0274] 表 30 :在指定温度和时间贮存后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的单体百分比(SEC 数据)(UB6 是 10 mM 柠檬酸盐,10 mM 磷酸盐 pH 6 ;低离子意指蛋白质在不添加另外的赋形剂的水中配制)。

缓冲液	T0	T7d50℃	T7d40℃	6 个月 25℃	12 个月 5℃
15mM 磷酸盐	98.38	93.84	97.92	94.73	93.84
15mM 乙酸盐	98.45	94.19	97.92	95.41	97.46
15mM 柠檬酸盐	98.35	93.92	98.03	95.35	97.49
15mM 琥珀酸盐	98.44	94.08	98.08	95.08	97.4
15mM 组氨酸	98.58	94.25	98.2	95.29	97.59
15mM 精氨酸	98.5	93.17	98.16	96.37	97.79
低离子	98.85	95.88	98.69	96.37	98.02
UB6+4% 山梨糖醇	98.16	94.86	98.11	95.5	97.4
UB6+4% 甘露醇	98.05	94.91	98.05	95.34	97.45
UB6+8% 蔗糖	98.52	95.08	98.09	95.77	97.5
UB6+8% 海藻糖	98.45	94.96	98.06	95.33	97.3
UB6+0.01%Tween80	98.43	93.98	97.88	92.78	96.76
UB6+2.5% 甘油	98.53	-----	97.74	95.2	97.24
UB6+15mM (NH4)2SO4	98.35	94.79	98.07	95.17	97.26
UB6+20mMNaCl	98.39	94.42	98	95.26	97.26
UB6+200mMNaCl	98.4	94.58	98.12	95.04	97.04
UB6+0.01%Tween20	98.42	94.08	97.84	94.66	97.23
UB6+0.1% 泊洛沙姆	98.47	94.54	97.98	95.07	97.16

[0275] 表 31 :在指定温度和时间贮存后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的聚集体百分比(SEC 数据)(UB6 是 10 mM 柠檬酸盐,10 mM 磷酸盐 pH 6 ;低离子意指蛋白质在不添加另外的赋形剂的水中配制)。

缓冲液	T0	T7d50℃	T7d40℃	6 个月 25℃	12 个月 5℃
15mM 磷酸盐	1.42	3.45	1.87	2.77	5.22
15mM 乙酸盐	1.34	3.47	1.88	2.32	1.65
15mM 柠檬酸盐	1.48	3.47	1.78	2.34	1.6
15mM 琥珀酸盐	1.35	3.31	1.73	2.61	1.66
15mM 组氨酸	1.22	3.51	1.6	2.29	1.5
15mM 精氨酸	1.3	4.54	1.63	1.73	1.39
低离子	0.95	1.53	1.07	1.61	1.01
UB6+4% 山梨糖醇	1.67	3.13	1.71	2.16	1.63
UB6+4% 甘露醇	1.77	2.91	1.76	2.28	1.63
UB6+8% 蔗糖	1.31	2.76	1.73	1.98	1.59

UB6+8% 海藻糖	1.37	3	1.75	2.4	1.65
UB6+0.01%Tween80	1.38	3.55	1.93	4.75	1.88
UB6+2.5% 甘油	1.29	-----	2.04	2.42	1.69
UB6+15mM (NH4)2SO4	1.49	3.22	1.74	2.44	1.68
UB6+20mMNaCl	1.43	3.33	1.81	2.26	1.63
UB6+200mMNaCl	1.42	3.28	1.69	2.47	1.93
UB6+0.01%Tween20	1.39	3.81	1.95	2.78	1.82
UB6+0.1% 泊洛沙姆	1.34	3.32	1.83	2.49	1.76

[0276] 表 32 :在指定温度和时间贮存后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的片段百分比(SEC 数据)(UB6 是 10 mM 柠檬酸盐,10 mM 磷酸盐 pH 6 ;低离子意指蛋白质在不添加另外的赋形剂的水中配制)。

缓冲液	T0	T7d50℃	T7d40℃	6 个月 25℃	12 个月 5℃
15mM 磷酸盐	0.20	2.71	0.2	2.49	0.93
15mM 乙酸盐	0.21	2.34	0.20	2.25	0.88
15mM 柠檬酸盐	0.17	2.61	0.19	2.29	0.9
15mM 琥珀酸盐	0.21	2.61	0.19	2.29	0.93
15mM 组氨酸	0.19	2.25	0.19	2.41	0.90
15mM 精氨酸	0.20	2.28	0.21	1.89	0.81
低离子	0.20	2.59	0.24	2.52	0.95
UB6+4% 山梨糖醇	0.17	2.01	0.18	2.33	0.96
UB6+4% 甘露醇	0.18	2.18	0.19	2.36	0.91
UB6+8% 蔗糖	0.17	2.16	0.19	2.23	0.89
UB6+8% 海藻糖	0.18	2.04	0.19	2.25	1.04
UB6+0.01%Tween80	0.19	2.46	0.20	2.45	1.34
UB6+2.5% 甘油	0.18	-----	0.21	2.36	1.06
UB6+15mM (NH4)2SO4	0.17	2	0.19	2.37	1.05
UB6+20mMNaCl	0.17	2.25	0.19	2.46	1.09
UB6+200mMNaCl	0.18	2.15	0.19	2.47	1.02
UB6+0.01%Tween20	0.19	2.11	0.20	2.54	0.94
UB6+0.1% 泊洛沙姆	0.18	2.14	0.19	2.42	1.07

[0277] 表 33 :在指定温度和时间贮存后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的多个种类百分比(iCIEF 数据)(UB6 是 10 mM 柠檬酸盐,10 mM 磷酸盐 pH 6 ;低离子意指蛋白质在不添加另外的赋形剂的水中配制)。

2SO4	40℃	84.46	12.13	3.41	6.89
UB6+20 mM NaCl	5℃	41.19	48.50	10.31	6.81
	25℃	47.99	42.16	9.85	6.79
	40℃	84.56	12.51	2.93	6.77
UB6+200 mM NaCl	5℃	33.13	58.03	8.84	6.92
	25℃	43.32	48.12	8.56	6.92
	40℃	84.26	10.55	5.19	6.91
UB6+0.01% Tween 20	5℃	33.71	57.18	9.11	6.93
	25℃	43.57	48.18	8.25	6.93
	40℃	84.79	12.37	2.84	6.90
UB6+0.1%泊洛沙姆	5℃	34.02	56.77	9.21	6.93
	25℃	42.82	49.11	8.07	6.93
	40℃	84.80	12.90	2.30	6.90
12 个月 5℃					
缓冲液		酸性	主要	碱性	pI 值
15 mM 磷酸盐	5℃	38.194	53.23	8.576	7.12
15 mM 乙酸盐	5℃	38.226	53.21	8.564	7.09
15 mM 柠檬酸盐	5℃	37.955	53.81	8.235	7.14
15 mM 琥珀酸盐	5℃	37.633	53.88	8.487	7.16
15 mM 组氨酸	5℃	36.612	54.71	8.678	7.13
15 mM 精氨酸	5℃	36.923	52.25	10.827	6.99
低离子	5℃	36.949	54.71	8.341	7.23
UB6+4%山梨糖醇	5℃	38.342	53.06	8.598	7.11
UB6+4%甘露醇	5℃	39.883	51.58	8.537	7.11
UB6+8%蔗糖	5℃	38.023	53.11	8.867	7.09
UB6+8%海藻糖	5℃	38.92	52.75	8.33	7.11
UB6+0.01% Tween 80	5℃	48.371	44.8	6.829	7.12
UB6+2.5%甘油	5℃	37.078	54.34	8.582	7.12
UB6+15 mM （NH4）2SO4	5℃	38.121	53.54	8.339	7.08
UB6+20 mM NaCl	5℃	42.232	49.73	8.038	6.9
UB6+200 mM NaCl	5℃	38.253	53.45	8.297	7.14
UB6+0.01% Tween 20	5℃	37.619	53.97	8.411	7.14
UB6+0.1%泊洛沙姆	5℃	38.145	53.13	8.725	7.15

[0278] PG110 稳定性随着增加的贮存温度减少，这是对于所有蛋白质的预期行为。然而，迄今收集的数据指出使用磷酸盐、精氨酸或甘油配制 PG110 将导致潜在变性。在与甘油一起 50℃贮存 7 天后，经由 SEC 未检测到蛋白质，指出所有 PG110 已经历物理不稳定性和不溶性聚集体形成，从而避免 SEC/UV 检测。

[0279] 实施例 9：缓冲液和配制赋形剂对贮存于 -80℃的 PG110 制剂的稳定性的影响。

[0280] 来自先前实施例的发现导致 15 mM 组氨酸和 0.01% tween 80 的制剂对于预防在原料药的液体制剂中的可见粒子形成是最佳的决定(实施例 6)。如实施例 7 中详述的，

Tween 80 也预防通过冻融应激诱导的亚可见粒子形成。加速稳定性测试(实施例 8)还测定两种赋形剂不引起无法接受水平的聚集或片段化。

[0281] 记住这点,接下来的关注是当贮存于 -80℃时,赋形剂是否引起原料药的失稳(destabilization)。为了测试这点,制备在最初制剂(10 mM 乙酸盐 125 mM NaCl)、15 mM 组氨酸 pH 6 和 15 mM 组氨酸 pH 6 + 0.01% Tween 80 中以 1 mg/ml 和 10 mg/ml 的 150 μl PG110 溶液,并且贮存于 -80℃在冷冻小瓶中。在 5 天时,从储库中取出每种样品的小瓶,并且通过 SEC 定量物理化学降解。在 10 天时,取出每种样品的剩余小瓶,并且同样方式分析。表 34、35 和 36 含有这些实验的结果。

[0282] 数据显示对于具有组氨酸或组氨酸 +tween 80 的制剂,% 单体从 0 到 5 天增加,并且保持在那个水平至少直至 10 天时。相比之下,在 10 mM 乙酸盐和 125 mM NaCl 中以 10 mg/ml 的 PG110 显示从 0 到 5 天到 10 天在 % 单体中的稳定减少,其对应于 % 聚集体的增加。总之,数据指出当贮存于 -80℃时,组氨酸 +tween 80 制剂不使原料药失稳。

[0283] 表 34. 在贮存于 -80℃后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的单体百分比(SEC 数据)。

缓冲液	T0	T5d -80℃		T10d -80℃	
	ave	ave	sd	ave	sd
1 mg/ml 10 mM 乙酸盐 125 mM NaCl	98.24	98.31	0.01	98.38	0.02
10 mg/ml 10 mM 乙酸盐 125 mM NaCl	98.24	97.99	0.01	97.77	0.02
1 mg/ml 组氨酸 pH 6	98.22	98.38	0.07	98.42	0.03
10 mg/ml 组氨酸 pH 6	98.22	98.47	0.01	98.44	0.02
1 mg/ml 组氨酸 pH 6 + 0.01% tween80	98.16	98.43	0.01	98.38	0.02
10 mg/ml 组氨酸 pH 6 + 0.01% tween80	98.16	98.45	0.01	98.43	0.01

[0284] 表 35. 在贮存于 -80℃后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的聚集体百分比(SEC 数据)。

缓冲液	T0	T5d -80℃		T10d -80℃	
	ave	ave	sd	ave	sd
1 mg/ml 10 mM 乙酸盐 125 mM NaCl	1.58	1.50	0.01	1.33	0.00
10 mg/ml 10 mM 乙酸盐 125 mM NaCl	1.58	1.81	0.01	1.92	0.02
1 mg/ml 组氨酸 pH 6	1.59	1.42	0.06	1.29	0.01
10 mg/ml 组氨酸 pH 6	1.59	1.33	0.00	1.28	0.01
1 mg/ml 组氨酸 pH 6 + 0.01% tween80	1.65	1.35	0.01	1.31	0.00
10 mg/ml 组氨酸 pH 6 + 0.01% tween80	1.65	1.33	0.00	1.24	0.00

[0285] 表 36. 在贮存于 -80℃后,在多种缓冲液和赋形剂中配制的 PG110 样品的片段百分比(SEC 数据)。

缓冲液	T0	T5d -80℃		T10d -80℃	
	ave	ave	sd	ave	sd
1 mg/ml 10 mM 乙酸盐 125 mM NaCl	0.18	0.19	0.00	0.29	0.02
10 mg/ml 10 mM 乙酸盐 125 mM NaCl	0.18	0.20	0.00	0.31	0.00
1 mg/ml 组氨酸 pH 6	0.19	0.19	0.01	0.30	0.02
10 mg/ml 组氨酸 pH 6	0.19	0.19	0.01	0.29	0.01
1 mg/ml 组氨酸 pH 6 + 0.01% tween80	0.19	0.22	0.00	0.32	0.02
10 mg/ml 组氨酸 pH 6 + 0.01% tween80	0.19	0.21	0.01	0.34	0.01

[0286] 目视检查数据还显示即使在 4 个 F/T 循环后，即使以 100 mg/mL，含有组氨酸的制剂也不含有可见粒子形成，进一步指出组氨酸是用于维持 PG110 稳定性的非常合适的赋形剂。

[0287] 实施例 10：冻融、搅拌和加速稳定性测试对以多个浓度在多种制剂中的 PG110 稳定性的影响

在多个应激实验中估计赋形剂对 PG110 稳定性的影响：

1）反复冻融处理（-80℃ /30℃水浴）；

2）搅拌以有效发挥搅拌应激且增加气体液体界面，以诱导物理不稳定性和 PG110 降解（6R 玻璃小瓶，环境温度，约 9 mm Teflon 包被的搅拌棒，550 rpm，最高 48 小时搅拌）；

3）加速稳定性测试：将多种样品置于（put on）在 2-5C、25 ℃ /60%relH 和 40℃ /60%relH 的实时和加速稳定性，并且通过 SEC/UV 监控蛋白质浓度和稳定赋形剂对天然 PG110 单体含量的影响。

[0288] 测试下述 PG110 制剂和制剂组合物：

制剂 1：52 mg/mL PG110，pH 6.0；

2.33 mg/mL 组氨酸；

5.0 mg/mL 蔗糖；

20.0 mg/mL 甘露醇；和

0.10 mg/mL 聚山梨醇酯 80。

[0289] 制剂 2：52 mg/mL PG110，pH 6.0；

2.33 mg/mL 组氨酸；

46 mg/mL 蔗糖；和

0.10 mg/mL 聚山梨醇酯 80。

[0290] 制剂 3：52 mg/mL PG110，pH 6.0. ；

2.33 mg/mL 组氨酸；

46 mg/mL 海藻糖；和

0.10 mg/mL 聚山梨醇酯 80。

[0291] 制剂 4：20 mg/mL PG110，pH 6.0；

2.33 mg/mL 组氨酸；

5.0 mg/mL 蔗糖；

20.0 mg/mL 甘露醇；和

0.10 mg/mL 聚山梨醇酯 80。

[0292] 制剂 5 :20 mg/mL PG110，pH 6.0 ；

2.33 mg/mL 组氨酸 ；

46 mg/mL 蔗糖 ；和

0.10 mg/mL 聚山梨醇酯 80。

[0293] 制剂 6 :20 mg/mL PG110，pH 6.0 ；

2.33 mg/mL 组氨酸 ；

46 mg/mL 海藻糖 ；和

0.10 mg/mL 聚山梨醇酯 80。

[0294] 在 2 和在 4 个 f/t 循环后，以 52 mg/mL 和 20 mg/mL 蛋白质浓度的 ABT110 抗体的冻融稳定性分别如下。

[0295] 表 37 :如通过 SEC/UV 测定的单体含量

	制剂(Form)#1	制剂 #2	制剂 #3	制剂 #4	制剂 #5	制剂 #6
0f/t	98.20	98.19	98.19	97.94	98.07	98.33
2f/t	98.22	98.21	98.20	98.07	98.19	98.31
4f/t	98.19	98.18	98.17	98.10	98.22	98.30

[0296] 前述数据证实蔗糖、海藻糖和甘露醇非常适合于在反复 f/t 应激过程中维持 PG110 的物理稳定性。贯穿应激实验就天然 PG110 单体含量而言基本上未检测到降解。

[0297] 在搅拌 24 和 48 小时后，在 52 mg/mL 和 20 mg/mL 蛋白质浓度的 ABT110 抗体的搅拌应激稳定性分别如下。

[0298] 表 38 :如通过 SEC/UV 测定的单体含量

	制剂 #1	制剂 #2	制剂 #3	制剂 #4	制剂 #5	制剂 #6
0 小时	98.20	98.19	98.18	97.94	98.07	98.33
24 小时	98.24	98.22	98.24	98.00	98.15	98.38
48 小时	98.20	98.21	98.20	97.96	98.08	98.36

[0299] 前述数据证实蔗糖、海藻糖和甘露醇非常适合于在广泛搅拌应激过程中维持 PG110 的物理稳定性。贯穿应激实验就天然 PG110 单体含量而言基本上未检测到降解。

[0300] 在 5℃ 14 天后和在 50℃ 14 天后，在 52 mg/mL 和 20 mg/mL 蛋白质浓度的 ABT110 抗体的加速降解动力学如下。

[0301] 表 39 :如通过 SEC/UV 测定的单体含量

	制剂 #1	制剂 #2	制剂 #3	制剂 #4	制剂 #5	制剂 #6
0 小时	98.20	98.19	98.19	97.94	98.07	98.33
14d,5℃	98.19	98.11	98.21	97.92	97.97	98.30
14d,50℃	85.16	85.09	85.29	84.82	85.04	84.82

[0302] 前述数据证实蔗糖、海藻糖和甘露醇非常适合于在较长期贮存过程中维持 PG110 的物理稳定性。即使当暴露于 50℃ 14 天时，在测试的所有样品中也存在超过 80% 的天然单体。

[0303] 实施例 11 :贮存于多种条件下的 PG110 冻干粉末的长期稳定性

进一步研究在 PG110 的冻干和贮存过程中蔗糖和甘露醇作为稳定剂的适合性。将用于注射溶液的 PG110 冻干粉末的两种制剂置于较长期贮存条件(2-8℃)、25°/60% RH 的加速贮存条件、和 40℃ /75% RH 和 50℃的应激条件下。由根据标准方法制造的 130 L 规模原料药产生且冻干这些实验室规模的原料药分批，例如如表 40 中所示。

[0304] 表 40 :对于制剂 1 和 2 的冻干条件

程序步骤	货架温度[±2℃]	压力 [mbar]	时间 [小鼠:分钟]
装载	+20℃	Atm.	---
冷冻	+20° 至 0℃	Atm.	0:20
	0℃	Atm.	2:10
	0℃至-45℃	Atm.	2:30
	-45℃	Atm.	3:00
初次干燥	-45℃	0.66±0.01	1:00
	-45℃至-25℃	0.66±0.01	1:00
	-25℃	0.66±0.01	90:00
二次干燥	-25℃	0.36±0.01	01:00
	-25℃至+25℃	0.36±0.01	04:30
	+25℃	0.36±0.01	08:00
保持步骤	+25℃至+5℃	0.36±0.01	0:30
	+5℃	0.36±0.01	---
预通气和关闭	+5℃	约 500	---
通气	+5℃	Atm.	---

[0305] 为了测试,在室温将制剂的样品重悬浮于无菌、蒸馏水中。

[0306] 制剂 1: 制剂 2:

20 mg/mL PG110,pH 5.5 20 mg/mL PG110,pH 5.5

2.33 mg/mL 组氨酸 2.33 mg/mL 组氨酸

70 mg/mL 蔗糖 10 mg/mL 蔗糖

0.1 mg/mL 聚山梨醇酯 80 30 mg/mL 甘露醇

0.1 mg/mL 聚山梨醇酯 80。

[0307] 在多个时间点执行与原料药的质量、生物学活性和纯度有关的测试方法,以评估 PG110 在每个分批中的稳定性概况。使用的分析方法包括 :

- 外观(目测)
- 粒子(目测)
- 亚可见粒子(光阻)
- pH
- 成像毛细管等电聚焦(icIEF)
- SDS PAGE (还原和非还原的)
- 尺寸排阻 HPLC
- 产物特异性抗原结合测定
- 产物特异性功能生物测定。

[0308] 使用染料渗透方法执行容器关闭完整性测试,其中使药物产品小瓶在亚甲蓝溶液中暴露于真空,并且随后就蓝色着色在视觉上检查。根据标准方法,按照 USP 测定含水量。对于来自分批 1 和分批 2 的样品获得的稳定性数据在表 41-48 中提供。

[0309] 表 41 :贮存于 2-8℃的 PG110 冻干制剂 1 的稳定性

测试	程序	特征	最初	1 个月	3 个月	6 个月
尺寸排阻 HPLC（SE-HPLC）	HPLC	聚集体[%]	1.6	1.7	1.6	1.6
		片段[%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		单体 [%]	98.3	98.3	98.3	98.4
毛细管等电聚焦（icIEF）	等电聚焦	酸性区域总和[%]	33.7	33.3	32.8	32.5
		主峰[%]	56.2	57.1	57.3	58.9
		碱性区域总和[%]	10.1	9.7	9.9	8.6
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 还原）	SDS-Page（R）					
		纯度[%]	99.6	99.5	99.6	99.7
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 非还原）	SDS-Page（NR）					
		纯度[%]	92.3	92.2	91.8	90.6
		存在于 97 kDa 处的条带[%]	0.3	0.3	0.3	0.4
微粒污染 - 亚可见粒子	亚可见粒子（LO）	粒子≥ 10 μm [/容器]	30	7	19	14
		粒子≥ 25 μm [/容器]	1	0	1	2

[0310] 表 42 :贮存于 25℃ /60% RH 的 PG110 冻干制剂 1 的稳定性

测试	程序	特征	最初	3 个月	6 个月
尺寸排阻 HPLC（SE-HPLC）	HPLC	聚集体[%]	1.6	1.8	1.6
		片段[%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		单体 [%]	98.3	98.2	98.4
毛细管等电聚焦（icIEF）	等电聚焦	酸性区域总和[%]	33.7	34.0	31.7
		主峰[%]	56.2	57.2	59.2
		碱性区域总和[%]	10.1	8.8	9.1
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 还原）	SDS-Page（R）				
		纯度[%]	99.6	99.6	99.8
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 非还原）	SDS-Page（NR）				
		纯度[%]	92.3	92.1	90.6
		存在于 97 kDa 处的条带[%]	0.3	0.4	0.3
微粒污染 - 亚可见粒子	亚可见粒子（LO）	粒子≥ 10 μm [/容器]	30	35	30
		粒子≥ 25 μm [/容器]	1	1	1

[0311] 表 43 :贮存于 40℃ /75% RH 的 PG110 冻干制剂 1 的稳定性

测试	程序	特征	最初	1 个月	3 个月	6 个月
尺寸排阻 HPLC（SE-HPLC）	HPLC	聚集体[%]	1.6	1.7	1.7	1.7
		片段[%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		单体 [%]	98.3	98.3	98.2	98.3
毛细管等电聚焦（icIEF）	等电聚焦	酸性区域总和[%]	33.7	33.6	33.1	32.5
		主峰[%]	56.2	56.4	55.9	55.1
		碱性区域总和[%]	10.1	10.0	11.0	12.3
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 还原）	SDS-Page（R）					
		纯度[%]	99.6	99.6	99.5	99.7
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 非还原）	SDS-Page（NR）					
		纯度[%]	92.3	92.6	91.4	90.9
		存在于 97 kDa 处的条带[%]	0.3	0.3	0.2	0.5
微粒污染 - 亚可见粒子	亚可见粒子（LO）	粒子≥ 10 μm [/容器]	30	6	35	12
		粒子≥ 25 μm [/容器]	1	0	1	1

[0312] 表 44 :贮存于 50℃的 PG110 冻干制剂 1 的稳定性

测试	程序	特征	最初	1 个月
尺寸排阻 HPLC（SE-HPLC）	HPLC	聚集体[%]	1.6	1.7
		片段[%]	< 0.1	< 0.1
		单体 [%]	98.3	98.2
毛细管等电聚焦（icIEF）	等电聚焦	酸性区域总和[%]	33.7	33.8
		主峰[%]	56.2	53.5
		碱性区域总和[%]	10.1	12.7
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 还原）	SDS-Page（R）			
		纯度[%]	99.6	99.6
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 非还原）	SDS-Page（NR）			
		纯度[%]	92.3	92.6
		存在于 97 kDa 处的条带[%]	-	-
微粒污染 - 亚可见粒子	亚可见粒子（LO）	粒子≥ 10 μm [/容器]	30	1
		粒子≥ 25 μm [/容器]	1	0

[0313] 表 45 :贮存于 2-8℃的 PG110 冻干制剂 2 的稳定性

测试	程序	特征	最初	1 个月	3 个月	6 个月
尺寸排阻 HPLC（SE-HPLC）	HPLC	聚集体[%]	1.9	1.9	2	1,8
		片段[%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		单体 [%]	98.1	98	98	98.2
毛细管等电聚焦（icIEF）	等电聚焦	酸性区域总和[%]	34.2	34	34	31.8
		主峰[%]	56.4	56.5	56.5	58.5
		碱性区域总和[%]	9.5	9.5	9.5	9.6
SDS 凝胶电泳（ SDS-PAGE 还原）	SDS-Page（R）					
		纯度[%]	99.6	99.4	99.5	99.5
SDS 凝胶电泳（ SDS-PAGE 非还原）	SDS-Page（NR）					
		纯度[%]	91.9	9.,7	90.7	90.2
		存在于 97 kDa 处的条带[%]	0.3	0.2	0.3	0.1
微粒污染 - 亚可见粒子	亚可见粒子（LO）	粒子≥ 10 μm [/容器]	43	6	19	25
		粒子≥ 25 μm [/容器]	1	0	0	0

[0314] 表 46 :贮存于 25℃ /60% RH 的 PG110 冻干制剂 2 的稳定性

测试	程序	特征	最初	3 个月	6 个月
尺寸排阻 HPLC（SE-HPLC）	HPLC	聚集体[%]	1,9	2,2	2,4
		片段[%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		单体 [%]	98,1	97,8	97,6
毛细管等电聚焦（icIEF）	等电聚焦	酸性区域总和[%]	34,2	34,1	32,6
		主峰[%]	56,4	55,7	56,5
		碱性区域总和[%]	9,5	10,2	10,9
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 还原）	SDS-Page（R）				
		纯度[%]	99.6	99.5	99,4
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 非还原）	SDS-Page（NR）				
		纯度[%]	91,9	91,9	90,1
		存在于 97 kDa 处的条带[%]	0,3	0,3	0,3
微粒污染 - 亚可见粒子	亚可见粒子（LO）	粒子≥ 10 μm [/容器]	43	28	26
		粒子≥ 25 μm [/容器]	1	0	1

[0315] 表 47 :贮存于 40℃ /75% RH 的 PG110 冻干制剂 2 的稳定性

测试	程序	特征	最初	1 个月	3 个月	6 个月
尺寸排阻 HPLC（SE-HPLC）	HPLC	聚集体[%]	1,9	3,1	5,2	8,4
		片段[%]	< 0.1	< 0.1	0.1	0.1
		单体 [%]	98,1	96,9	94,8	91,6
毛细管等电聚焦（icIEF）	等电聚焦	酸性区域总和[%]	34,2	34,6	33,6	39
		主峰[%]	56,4	47,8	33,8	21,4
		碱性区域总和[%]	9,5	17,6	32,6	39,6
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 还原）	SDS-Page（R）					
		纯度[%]	99.6	99.4	99.1	98,5
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 非还原）	SDS-Page（NR）					
		纯度[%]	91,9	92,4	89,3	84,5
		存在于 97 kDa 处的条带[%]	0,3	0,2	0,2	0,2
微粒污染 - 亚可见粒子	亚可见粒子（LO）	粒子≥ 10 μm [/容器]	43	4	42	18
		粒子≥ 25 μm [/容器]	1	0	0	0

[0316] 表 48 :贮存于 50℃的 PG110 冻干制剂 2 的稳定性

测试	程序	特征	最初	1 个月
尺寸排阻 HPLC（SE-HPLC）	HPLC	聚集体[%]	1,9	6,2
		片段[%]	< 0.1	< 0.1
		单体 [%]	98,1	93,8
毛细管等电聚焦（icIEF）	等电聚焦	酸性区域总和[%]	34,2	33,7
		主峰[%]	56,4	33,5
		碱性区域总和[%]	9,5	32,8
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 还原）	SDS-Page（R）			
		纯度[%]		
SDS 凝胶电泳（SDS-PAGE 非还原）	SDS-Page（NR）			
		纯度[%]	91,9	93
		存在于 97 kDa 处的条带[%]	0,3	0,2
微粒污染 - 亚可见粒子	亚可见粒子（LO）	粒子≥ 10 μm [/容器]	43	2
		粒子≥ 25 μm [/容器]	1	0

[0317] 关于来自贮存于 2 - 8℃的预期贮存条件下的制剂 1 和 2 的样品以及贮存于 25℃和 40℃下 6 个月的样品的所有数据都满足验收标准，并且在这些温度的稳定性参数测试的任何中未观察到显著变化。在更极端的应激条件（50℃）贮存一个月导致纯度中的下降，这仅对于 icIEF 是显而易见的。

[0318] 制剂 1 和 2 在 40℃在 6 个月内的比较指出用单独的蔗糖配制的 PG110 抗体证实比

用蔗糖和甘露醇的组合配制的抗体更高水平的稳定性(图1)。此外,令人惊讶地观察到即使在40℃的加速稳定性研究时,在这些制剂中亚可见和可见粒子的形成也不随着时间过去而改变,所述制剂含有大于1400的糖和/或多元醇:蛋白质的摩尔比(例如制剂1-蛋白质:糖 = 1:1515;制剂2-蛋白质:糖+多元醇比 = 1436)。

[0319] *引入作为参考*

本发明引入其在蛋白质配制领域中众所周知的完整技术作为参考。这些技术包括但不限于,在下述出版物中描述的技术:Ausubel等人(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley & Sons,NY(1993);Ausubel,F. M.等人编辑,Short Protocols In Molecular Biology(第4版1999)John Wiley & Sons,NY.(ISBN 0-471-32938-X). Controlled Drug Bioavailability Drug Product Design and Performance,Smolen和Ball(编辑),Wiley,New York(1984);Giege,R.和Ducruix,A. Barrett,Crystallization of Nucleic Acids and Proteins,a Practical Approach,第2版,第20 1-16页,Oxford University Press,New York,N.Y.,(1999);Goodson,in Medical Applications of Controlled Release,第2卷,第115-138页(1984);Hammerling等人,in:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier,N.Y.,1981;Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版1988);Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987)和(1991);Kabat,E. A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S. Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242;Kontermann和Dubel编辑,Antibody Engineering(2001)Springer-Verlag. New York. 第790页(ISBN 3-540-41354-5);Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);Lu和Weiner编辑,Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis(2001)BioTechniques Press. Westborough,Mass. 298 pp.(ISBN 1-881299-21-X),Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编辑),CRC Pres.,Boca Raton,Fla.(1974);Old,R. W. & S. B. Primrose,Principles of Gene Manipulation:An Introduction To Genetic Engineering(第3版1985)Blackwell Scientific Publications,Boston. Studies in Microbiology;第2卷:第409页(ISBN 0-632-01318-4);Sambrook,J.等人编辑,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY. 第1-3卷(ISBN 0-87969-309-6);Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J. R. Robinson,编辑,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978;Winnacker,E. L. From Genes To Clones:Introduction To Gene Technology(1987)VCH Publishers,N.Y.(由Horst Ibelgaufts翻译). 第634页(ISBN 0-89573-614-4)。

[0320] *等价方案*

本发明可以以其他具体形式体现而不背离其精神或基本特征。前述实施方案因此在所有方面视为本文描述的本发明的举例说明而不是限制。本发明的范围因此通过附加权利要求而不是前述说明书指出,并且所有改变。

[0321] 序列表概述

SEQ ID NO: 1 (PG110 V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNSALKSRFTISR
DNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 2 (PG110 V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDY
TLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 3 (PG110 V_H CDR 1)

GFSLTNNNVN

SEQ ID NO: 4 (PG110 V_H CDR 2)

GVWAGGATDYNSALKS

SEQ ID NO: 5 (PG110 V_H CDR 3)

DGGYSSSTLYAMDA

SEQ ID NO: 6 (PG110 V_L CDR 1)

RASEDIYNALA

SEQ ID NO: 7 (PG110 V_L CDR 2)

NTDTLHT

SEQ ID NO: 8 (PG110 V_L CDR 3)

QHYFHYPRT

SEQ ID NO:9（野生型人 IgG4 恒定区）

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**S**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:10（丝氨酸至脯氨酸突变的人 IgG4 恒定区）

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:11（PG110 完全重链核苷酸序列，包括信号序列）

ATGGAATGGAGCTGGGTGTTCCTGTTCTTCCTGAGCGTGACCACCGGCGTGCACAGCGAGGTGC
AGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCCGC
CAGCGGCTTCAGCCTGACCAACAACAACGTGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTG
GAATGGGTGGGCGGCGTGTGGGCCGGGGGAGCCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGT
TCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGA
GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGGCGGCTACAGCAGCAGCACCCTGTACGCCATG
GACGCCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGT
TCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA
GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGGGTGCAC
ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCA
GCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCACCCTGCCCCCCATGCCCAGCCCCCGAGTTCCTG
GGCGGACCCTCCGTGTTTCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC
CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCAGAGGTCCAGTTCAACTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTTAACAGCACC
TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA
GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCTCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG
GCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCT
GTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCCTGGGCAAGTGA

SEQ ID NO:12（PG110 完全重链氨基酸序列，包括信号序列）

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVW
AGGATDYNSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:13（PG110 成熟重链氨基酸序列，排除信号序列）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNSALKSRFTISR
DNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN
TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:14（PG110 完全轻链核苷酸序列，包括信号序列）

ATGAGCGTGCCCACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACA
TCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTG
CAGGGCCAGCGAGGACATCTACAACGCCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
AAGCTGCTGATCTACAACACCGACACCCTGCACACCGGCGTGCCCAGCAGGTTCAGCGGCAGCG
GCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTT
TTGCCAGCACTACTTCCACTACCCCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGG
ACCGTGGCTGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCG
CCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA
CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC
TACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT
GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTG
A

SEQ ID NO:15（PG110 完全轻链氨基酸序列，包括信号序列）

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNT
DTLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO :16（PG110 成熟轻链氨基酸序列，排除信号序列）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDY
TLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

序列表

<110> ABBOTT RESEARCH BV

<120> 抗神经生长因子(NGF)抗体组合物

<130> PNJ-026PC

<140> New Application
<141> Concurrently Herewith

<150> 61/314984
<151> 2010-03-17

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注 =" 人工序列的描述 :合成多肽 "

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Asn
			20					25					30		

Asn	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注 =" 人工序列的描述 :合成多肽 "

<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成肽 "

<400> 3
Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn Asn Val Asn
1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成肽 "

<400> 4
Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成肽 "

<400> 5
Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成肽 "

<400> 6
Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成肽 "

<400> 7
Asn Thr Asp Thr Leu His Thr
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成肽 "

<400> 8
Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 9
<211> 327
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 10
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成多肽 "

<400> 10

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110
```

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 11
<211> 1407
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注 =" 人工序列的描述 :合成多核苷酸 "

<400> 11
atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttc ctgagcgtga ccaccggcgt gcacagcgag 60

gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagccag gcggcagcct gaggctgtcc 120

tgcgccgcca gcggcttcag cctgaccaac aacaacgtga actgggtgcg gcaggcccca 180

ggcaagggcc tggaatgggt gggcggcgtg tgggccgggg gagccaccga ctacaacagc 240

gccctgaaga gcaggttcac catcagcagg gacaacagca agaacaccgc ctacctgcag 300

atgaacagcc tgagggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cggcggctac 360

agcagcagca ccctgtacgc catggacgcc tggggccagg gcaccctggt gaccgtgagc 420

agcgccagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc cctgcagcag aagcaccagc 480

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 540

tcctggaaca gcggagccct gaccagcggg gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 600

agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggcaccaag 660

acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagggtggag 720

agcaagtacg gcccaccctg ccccccatgc ccagcccccg agttcctggg cggaccctcc 780

gtgtttctgt tcccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccgaggtg 840

acctgcgtgg tggtggacgt gagccaggaa gatccagagg tccagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt taacagcacc 960

tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa gggcctgccc agctccatcg agaaaaccat cagcaaggcc 1080

aagggccagc cacgggagcc ccaggtgtac accctgccac cctcccagga agagatgacc 1140

aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct accccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccacccccc agtgctggac 1260

agcgacggca gcttcttcct gtacagcagg ctgaccgtgg acaagtccag gtggcaggaa 1320

ggcaacgtct ttagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1380

agcctgtccc tgagcctggg caagtga 1407

<210> 12
<211> 468

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成多肽 "

<400> 12

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Thr Asn Asn Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Ala Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
85 90 95

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met
115 120 125

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Gly Lys
465

<210> 13
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成多肽 "

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 14
<211> 705
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> / 注 =" 人工序列的描述 : 合成多核苷酸 "

<400> 14
atgagcgtgc ccacccaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagggtgacc 120

atcacctgca gggccagcga ggacatctac aacgccctgg cctggtatca gcagaagccc 180

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accgacaccc tgcacaccgg cgtgcccagc 240

aggttcagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 300

gaggacttcg ccacctactt ttgccagcac tacttccact accccaggac cttcggccag 360

ggcaccaagg tggagatcaa gaggaccgtg gctgccccca gcgtgttcat cttcccccccc 420

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 480

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 540

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 600

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gctga 705

<210> 15
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注 =" 人工序列的描述 :合成多肽 "

<400> 15
Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp
35 40 45

Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe
100 105 110

His Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 16
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注 =" 人工序列的描述 :合成多肽 "

<400> 16
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

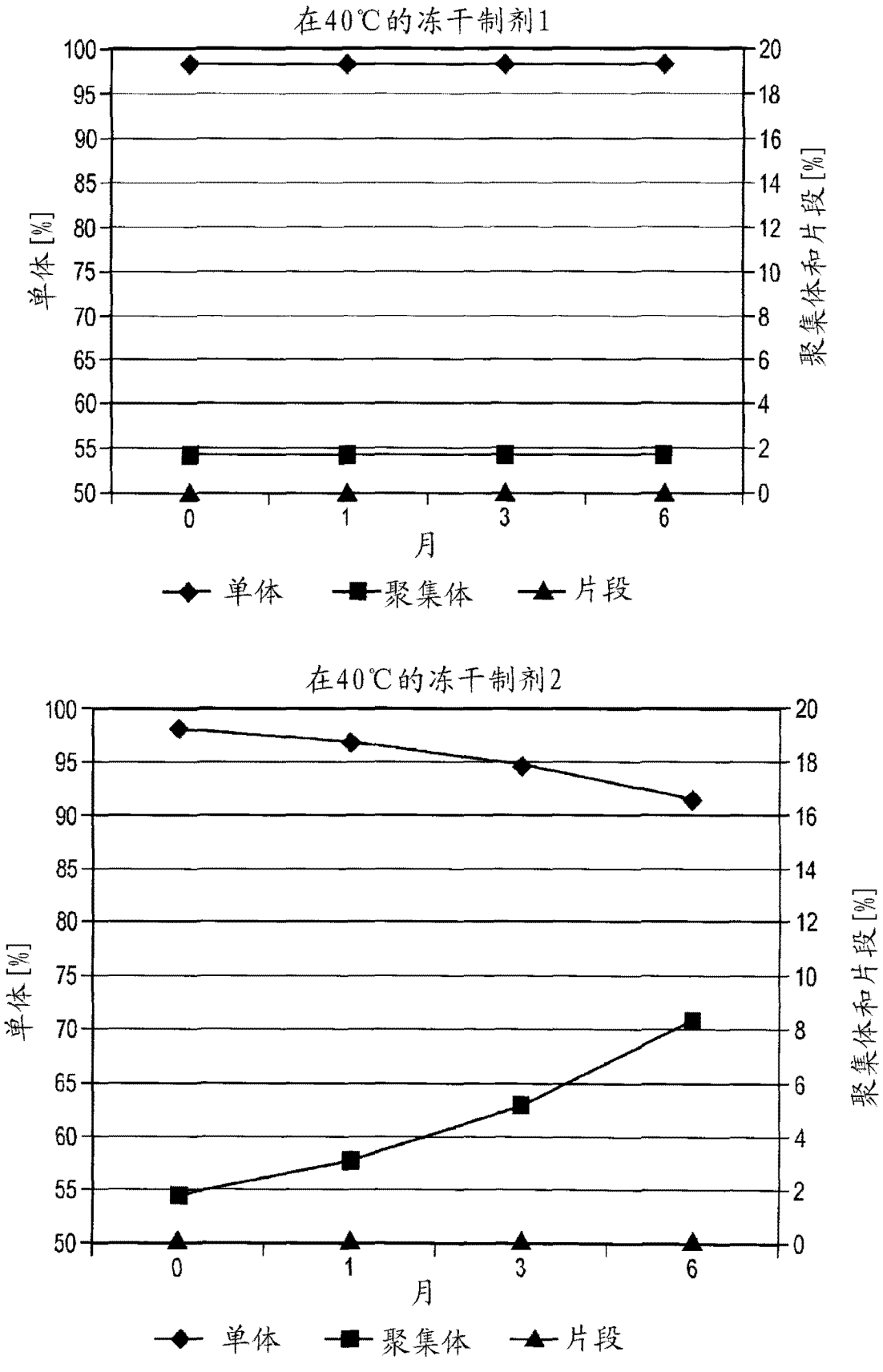

在40℃的冻干制剂1
单体[%]
聚集体和片段[%]
月
单体
聚集体
片段
在40℃的冻干制剂2
单体[%]
聚集体和片段[%]
月
单体
聚集体
片段

图 1