



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102271707 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 200980153163. 0

A61P 29/00(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 10. 29

A61P 37/02(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 19/02(2006. 01)

61/109, 474 2008. 10. 29 US

A61P 19/08(2006. 01)

A61P 17/06(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 1/04(2006. 01)

2011. 06. 29

A61P 1/00(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G06F 19/00(2011. 01)

PCT/US2009/062611 2009. 10. 29

G06Q 90/00(2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

(56) 对比文件

W02010/077422 EN 2010. 07. 08

WO 2006/122786 A2, 2006. 11. 23,

(73) 专利权人 阿布林克斯公司

WO 2007/095337 A2, 2007. 08. 23,

地址 比利时兹韦纳尔德

WO 2006/122786 A2, 2006. 11. 23,

WO 2007/095337 A2, 2007. 08. 23,

(72) 发明人 贾森 .E. 费尔南德斯

审查员 金武

丹尼尔 .A. 狄克逊

安德烈亚 . 保尔森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 曹立莉

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

A61K 9/19(2006. 01)

A61K 9/00(2006. 01)

权利要求书3页 说明书42页

序列表6页 附图16页

(54) 发明名称

单域抗原结合性分子的制剂

(57) 摘要

本发明涉及一种单域抗原结合性分子的制剂,例如纳米抗体分子,特别是TNF结合性纳米抗体分子的制剂。这种单域抗原结合性分子可包括一个或多个与一种或多种靶蛋白相互作用,例如与一种或多种靶蛋白结合的单结合域。所述制剂可用作例如药物制剂。还公开了制备本文所述的制剂以及将其用于治疗例如TNF相关病症的方法。

1. 一种制剂,所述制剂包含:

- (a) 浓度从 10mg/mL 至 250mg/mL 的 TNF 结合性纳米抗体分子;
- (b) 浓度为 5% 至 10% 的选自蔗糖、山梨糖醇或海藻糖的冻干保护剂;
- (c) 浓度为 0.01% 至 0.6% 的聚山梨酯 -80 ;和
- (d) 选自浓度 10 至 20mM 的组氨酸缓冲剂或浓度 20mM 的 Tris 缓冲剂的缓冲剂,从而使

所述制剂的 pH 为 5.0-7.5,

其中所述制剂中的 TNF 结合性纳米抗体分子在 4°C 储存至少三个月后至少保留其结合活性的 70% ;

并且其中所述 TNF 结合性纳米抗体分子示于图 30 中 (SEQ ID NO:1)。

2. 权利要求 1 的制剂,所述制剂:

- (i) 在 4°C 储存至少 12 个月后具有少于 5% 的高分子量 (HMW) 物质;
- (ii) 在 4°C 储存至少 12 个月后具有少于 5% 的低分子量 (LMW) 物质;
- (iii) 在 4°C 储存至少 12 个月后具有少于 10% 的酸性物质 ;和 / 或
- (iv) 在 4°C 储存至少 12 个月后具有少于 5% 的碱性物质。

3. 权利要求 1 的制剂,所述制剂是液体的、冻干的、冻干复原的或冷冻散装储存的形式。

4. 权利要求 1-3 中任一项的制剂,所述制剂是液体或冻干制剂,其包含:

- (a) 浓度从 10mg/mL 至 130mg/mL 的 TNF 结合性纳米抗体分子;
- (b) 浓度为 5% 至 10% 的蔗糖;
- (c) 浓度为 0.01% -0.02% 的聚山梨酯 -80 ;和
- (d) 选自以下的缓冲剂:浓度 10 至 20mM 的组氨酸缓冲剂,从而使所述制剂的 pH 为

5.0-7.5 ;

其中所述 TNF 结合性纳米抗体分子示于图 30 中 (SEQ ID NO:1)。

5. 一种制剂,所述制剂为散装储存制剂,其包含:

- (a) 浓度为 80mg/mL 至 280mg/mL 的 TNF 结合性纳米抗体分子;
- (b) 浓度为 5% 至 10% 的蔗糖;
- (c) 浓度为 0.01% -0.02% 的聚山梨酯 -80 ;和
- (d) 选自以下的缓冲剂:浓度 10 至 20mM 的组氨酸缓冲剂,从而使所述制剂的 pH 为

5.0-7.5,

其中将至少 100 升所述制剂储存在低于冰点的条件下;

其中所述 TNF 结合性纳米抗体分子示于图 30 中 (SEQ ID NO:1)。

6. 权利要求 1-3 中任一项的制剂,其中所述制剂的 pH 选自:5、5.5、6.0、6.1、6.5 和 7。

7. 权利要求 1-3 中任一项的制剂,其中所述制剂的 pH 为 5.8-6.1。

8. 权利要求 1-3 中任一项的制剂,其中所述蔗糖、山梨糖醇或海藻糖的浓度为 5%、7.5% 或 10%。

9. 一种制备 TNF 结合性纳米抗体分子的制剂的方法,其包括:

在细胞培养中表达所述 TNF 结合性纳米抗体;

通过使所述 TNF 结合性纳米抗体分子通过至少一个色谱纯化步骤,或超滤 / 渗滤步骤来纯化所述 TNF 结合性纳米抗体;

将所述 TNF 结合性纳米抗体在制剂中的浓度调节至 10-250mg/mL, 所述制剂含有浓度 5% 至 10% 的蔗糖 ; 浓度 0.01% 至 0.02% 的聚山梨酯 -80 ; 和浓度 10 至 20mM 的组氨酸缓冲剂或浓度 20mM 的 Tris 缓冲剂, 从而使所述制剂的 pH 为 5-7.5 ;

其中所述 TNF 结合性纳米抗体分子示于图 30 中 (SEQ ID NO:1)。

10. 一种制备含有 TNF 结合性纳米抗体分子的复原的制剂的方法, 其包括 :

将 TNF 结合性纳米抗体分子和冻干保护剂、表面活性剂和缓冲剂的混合物冻干, 由此形成冻干混合物 ; 和

在稀释剂中复原所述冻干混合物, 由此制备所述制剂, 其中所述复原的制剂包含 (a) 浓度为 10mg/mL 至 130mg/mL 的 TNF 结合性纳米抗体分子 ; (b) 浓度为 5% 至 10% 的选自蔗糖或海藻糖的冻干保护剂 ; (c) 浓度为 0.01% 至 0.02% 的作为表面活性剂的聚山梨酯 -80 ; 和 (d) 浓度为 10 至 20mM 的组氨酸缓冲剂, 或浓度为 20mM 的 Tris 缓冲剂, 由此使所述制剂的 pH 为 5.0-7.5 ;

其中所述 TNF 结合性纳米抗体分子示于图 30 中 (SEQ ID NO:1)。

11. 试剂盒或制品, 其包含含有权利要求 1-8 中任一项所述的制剂的容器, 和使用说明书。

12. 权利要求 11 的试剂盒或制品, 其中所述制剂存在于小瓶或注射器中。

13. 权利要求 11 的试剂盒或制品, 其中所述制剂存在于预充式注射器中。

14. 权利要求 13 的试剂盒或制品, 其中所述注射器或小瓶由玻璃或塑料构成。

15. 权利要求 13 的试剂盒或制品, 其中所述注射器或小瓶由选自环烯烃聚合物或共聚物的聚合材料构成。

16. 权利要求 1-8 任一项的制剂在制备用于治疗或预防 TNF 相关病症的药物中的用途, 其包括向受试者给药包含所述制剂的药物组合物, 由此减少一种或多种与所述 TNF 相关病症有关的症状, 其中所述 TNF 相关病症是炎性病症或自身免疫病症。

17. 权利要求 1-8 任一项的制剂在制备用于治疗或预防 TNF 相关病症的药物中的用途, 其包括向受试者给药包含所述制剂的药物组合物, 由此减少一种或多种与所述 TNF 相关病症有关的症状, 其中所述 TNF 相关病症选自类风湿性关节炎和关节炎性病状。

18. 权利要求 17 的制剂的用途, 其中所述关节炎性病状选自银屑病关节炎、多关节型幼年特发性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、炎性肠疾病和多发性硬化。

19. 制造工艺中测定参数是否满足预先选择的标准的方法, 其包括 :

提供权利要求 1-7 中任一项的制剂样品 ;

评价选自颜色、透明度、粘度、或一种或多种 HMW、LMW、酸性物质或碱性物质的量的制剂参数 ;

判定所述参数是否满足所述预先选择的标准。

20. 权利要求 19 的方法, 其还包括在监测或控制批次间变化的方法中比较两种或更多种样品制剂或者将所述样品与参照标准比较。

21. 权利要求 20 的方法, 其还包括基于所述比较进行分类, 选择, 接受或放弃, 发放或扣留, 加工成药物产品, 运输, 移至不同地点, 配制, 标记, 包装成制剂。

22. 权利要求 21 的方法, 其还包括提供记录, 所述记录包括涉及制剂的评价参数的数

据并任选包括一批制剂的标识；将所述记录提交给决定者；任选地，从所述决定者处接收信息；任选地，基于来自所述决定者的信息决定是否发放或上市出售该批制剂。

单域抗原结合性分子的制剂

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2008 年 10 月 29 日提交的 U. S. Serial No. 61/109, 474 的优先权, 将该申请的全部内容通过提述以其整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 当前申请含有已经藉由 EFS-Web 提交并通过提述以其整体并入本文的序列表。所述 ASCII 拷贝 (创建于 2009 年 10 月 27 日) 命名为 W22373W0. txt, 且大小为 8, 343 字节。

背景技术

[0005] 生物技术的进步使得利用重组 DNA 技术产生多种多样的蛋白质以供药学应用成为可能。由于蛋白质比起传统有机或无机药物有更大且更复杂的趋势, 所以这些蛋白质的制剂存在特殊的问题。为了使蛋白质保持生物学活性, 制剂必需保留至少是所述蛋白质氨基酸的核心序列的构象完整性, 同时保护所述蛋白质的多个官能团不被降解。蛋白质的降解途径可能涉及化学不稳定性 (即任何涉及通过键的形成或断裂而产生新的化学实体的蛋白质修饰的过程) 或物理不稳定性 (即蛋白质高级结构中的变化)。化学不稳定性可因例如脱酰胺化、外消旋、水解、氧化、 β 消除或二硫键转换造成。物理不稳定性可因例如变性、聚集、沉淀或吸附造成。三种常见的蛋白质降解途径是蛋白质聚集、脱酰胺化和氧化 (Cleland 等, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4) : 307-377 (1993))。

[0006] 冷冻干燥是一种经常采用的用于保存蛋白质的技术, 其用于从感兴趣的蛋白质制备物去除水。冷冻干燥, 或冻干, 是这样一种过程, 通过该过程首先将待干燥的材料冷冻, 然后通过真空环境中的升华作用去除冰或冷冻溶剂。可在预冻干的制剂中包括赋形剂以增强所述冷冻干燥工艺过程中的稳定性和 / 或改进所述冻干产品储存时的稳定性 (Pikal, *M. Biopharm.* 3(9) 26-30 (1990) 和 Arakawa 等, *Pharm. Res.* 8(3) : 285-291 (1991))。

[0007] 因此, 仍然存在对于开发就长期储存和运输而言稳定的蛋白制剂 (特别是用于皮下施用的) 的需求。

发明内容

[0008] 本发明涉及单域抗原结合性分子 (single domain antigen binding molecules) (在本文中称作“SDAB 分子”) (例如, 纳米抗体 (nanobody) 分子, 特别是 TNF 结合性纳米抗体分子) 的制剂。所述 SDAB 分子可包括一个或多个单抗原结合域, 其与一个或多个靶蛋白相互作用, 例如结合至一个或多个靶蛋白。所述制剂是有用的, 例如作为药物制剂, 用于向受试者 (例如, 人) 施用。还公开了制备和使用本文所述的制剂以治疗或预防例如 TNF 相关病症的方法。

[0009] [注意 : Nanobody™ 和 Nanobodies™ (纳米抗体™) 是 Ablynx N. V. 的注册商标]

[0010] 因此, 在一个方面, 本发明描述了一种制剂, 其包括 (a) SDAB 分子, 例如, 纳米抗体分子 (例如, TNF 结合性纳米抗体分子); (b) 冻干保护剂; (c) (任选地) 表面活性剂; (d)

(任选地)填充剂(bulking agent);(e)(任选地)张度调节剂;(f)(任选地)稳定剂;(g)(任选地)防腐剂,和(h)缓冲剂,使得所述制剂的pH约为5.0-7.5。在一些实施方案中,所述制剂是液体制剂,冻干制剂,复原的冻干制剂,气溶胶制剂,或散装储存(bulk storage)制剂(例如,冷冻散装储存制剂)。在一些实施方案中,所述制剂通过注射(例如,皮下,血管内,肌肉内或腹膜内)或通过吸入向受试者给药。

[0011] 在一些实施方案中,所述制剂中的SDAB分子,例如,纳米抗体分子(例如,TNF结合性纳米抗体分子)的浓度为约0.5mg/mL至约350mg/mL,约0.5mg/mL至约300mg/mL,约0.5mg/mL至约250mg/mL,约0.5mg/mL至约150mg/mL,约1mg/ml至约130mg/mL,约10mg/ml至约130mg/mL,约50mg/ml至约120mg/mL,约80mg/ml至约120mg/mL,约88mg/ml至约100mg/mL或约10mg/ml,约25mg/ml,约50mg/ml,约80mg/ml,约100mg/mL,约130mg/ml,约150mg/ml,约200mg/ml,约250mg/ml或约300mg/ml。

[0012] 在其他实施方案中,所述制剂的冻干保护剂是糖,例如,蔗糖、山梨糖醇或海藻糖。例如,所述冻干保护剂可以是浓度为约2.5%至约10%,约5%至约10%,约5%至约8%,或约4%,约4.5%,约5%,约5.5%,约6%,约6.5%,约7%,约7.5%,约8%,约8.5%,或约9%(重量/体积)的蔗糖、山梨糖醇或海藻糖。

[0013] 在其他实施方案中,所述制剂中的缓冲剂是浓度为约5mM至约50mM,约5mM至约40mM,约5mM至约30mM,约10mM至约20mM,或约10mM,约20mM,或约30mM的组氨酸缓冲剂。在其他实施方案中,所述制剂中的缓冲剂是以低于约5mM至约50mM,约5mM至约40mM,约5mM至约30mM,约10mM至约20mM,或约10mM,约20mM,或约30mM的浓度存在的Tris缓冲剂。所述制剂的缓冲剂的pH通常在约5和7之间。在一些具体的实施方案中,所述制剂的缓冲剂的pH为约5至约7.5,约5.5至约7.2。例如,所述缓冲剂的pH可以为约5、5.5、5.8-6.1、6.1、6.5或7。

[0014] 在一些实施方案中,所述制剂(任选)包含浓度为约0.001%至0.6%,例如,约0.01%至0.6%,约0.1%至0.6%,约0.1%至0.5%,约0.1%至0.4%,约0.1%至0.3%,约0.1%至0.2%,或约0.01%至0.02%的表面活性剂。在一些情况下,所述制剂含有大于0%且至多约0.6%(例如,约0.1%至0.2%)的聚山梨酯-20、聚山梨酯-40、聚山梨酯-60、聚山梨酯-65、聚山梨酯-80、聚山梨酯-85、泊洛沙姆-188、失水山梨糖醇单月桂酸酯、失水山梨糖醇单棕榈酸酯、失水山梨糖醇单硬脂酸酯、失水山梨糖醇单油酸酯、失水山梨糖醇三月桂酸酯、失水山梨糖醇三硬脂酸酯、失水山梨糖醇三油酸酯、或其组合。在具体的实施方案中,所述制剂含有约0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%至0.02%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.1%至0.2%、0.11%、0.12%、0.13%、0.14%、0.15%、0.16%、0.17%、0.18%、0.19%或0.2%的聚山梨酯-80。或者,所述制剂可以包含约0.01%至0.6%、约0.1%至0.6%、约0.1%至0.5%、约0.1%至0.4%、约0.1%至0.3%、或约0.1%至0.2%的泊洛沙姆-188。

[0015] 在一些实施方案中,所述制剂(任选)包含填充剂,例如,甘氨酸,其浓度为约10至约200mM,约25至约175mM,约50至约150mM,约75至约125mM,或约100mM。

[0016] 在其他实施方案中,所述制剂(任选)还包含张度调节剂,例如,使所述制剂与人血基本上等张或等渗的分子。示例性张度调节剂包括蔗糖、山梨糖醇、甘氨酸、甲硫氨酸、甘

露醇、右旋糖、肌醇、氯化钠、精氨酸和盐酸精氨酸。

[0017] 在其他实施方案中,所述制剂(任选)额外包含稳定剂,例如,当与感兴趣的蛋白质(例如SDAB分子)组合时基本上防止或减少以冻干、液体或储存形式的感兴趣蛋白质的化学和/或物理不稳定性的分子。示例性稳定剂包括蔗糖、山梨糖醇、甘氨酸、肌醇、氯化钠、甲硫氨酸、精氨酸和盐酸精氨酸。在一些实施方案中,所述制剂以一种或多种下述范围包含稳定剂:约1%至约12%(例如,约5%,约7.5%,约8%或约10%)的蔗糖;约1%至约7%(例如,约3%,约4%,约5%)的山梨糖醇;约1%至约5%的肌醇;约10mM至约125mM(例如,约25mM至100mM,约80mM,约90mM,或约100mM)的甘氨酸;约10mM至150mM(例如,约25mM至100mM,约55mM)的氯化钠;约10mM至约100mM(例如,约10mM,约20mM,约100mM)的甲硫氨酸;约10mM至约125mM(例如,约25mM至约120mM,或约100mM)的精氨酸;约10mM至约70mM(例如,约10mM至约65mM,或约55mM)的盐酸精氨酸。

[0018] 在其他实施方案中,所述制剂可进一步包括甲硫氨酸,其浓度为约10至约200mM,约25至约175mM,约50至约150mM,约75至约125mM,或约100mM。

[0019] 在一个实施方案中,所述制剂的某个组分可作为冻干保护剂、张度调节剂和/或稳定剂中的一种或多种发挥功能。例如,取决于组分(例如,蔗糖)的浓度,其能够充当冻干保护剂、张度调节剂和/或稳定剂中的一种或多种。在制剂中需要数种组分的其他实施方案中,使用不同的组分。例如,在制剂需要冻干保护剂、张度调节剂和稳定剂的情况下,使用不同的组分(例如,蔗糖、甘氨酸和肌醇可以组合使用,产生分别为冻干保护剂、张度调节剂和稳定剂的组合)。

[0020] 在一个实施方案中,所述制剂包括(a)SDAB分子,例如,纳米抗体分子(例如,TNF结合性纳米抗体分子),其浓度为约0.5至约300mg/mL,例如,约1mg/mL,约10mg/mL,约25mg/mL,约50mg/mL,约80mg/mL,约88mg/mL,约100mg/mL,约118mg/mL,约130mg/mL,约150mg/mL,或约250mg/mL;(b)浓度为约5%至约10%,例如,约5%,约6%,约6.5%,约7%,约7.5%,约8%,约10%的蔗糖;(c)浓度为约0至约0.6%,例如,0.01%,0.02%,0.05%,0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%,或0.6%的聚山梨酯-80;(d)(任选地)浓度为约0至约100mM,例如,100mM的甘氨酸;(e)(任选地)浓度为约0至约100mM,例如,100mM的甲硫氨酸;和(f)组氨酸缓冲剂(浓度约10mM至约20mM)或Tris缓冲剂(浓度约20mM),使得所述制剂的pH为约5.0至7.5,例如,5、5.5、5.8-6.1、6、6.1、6.5、或7。

[0021] 在一个实施方案中,所述制剂是液体制剂。在一个代表性实施方案中,所述液体制剂包括a)SDAB分子,例如纳米抗体分子(例如,TNF结合性纳米抗体分子),其浓度为约10至约150mg/mL,例如,约25mg/mL,约50mg/mL,约80mg/mL,约88mg/mL,约100mg/mL,约118mg/mL,约130mg/mL;(b)浓度为约5%至约10%,例如,约7%至约8%,例如,7.5%的蔗糖;或约1%至约7%(例如,约3%,约4%,约5%)的山梨糖醇(c)浓度为约,例如,约0.01%至0.02%(例如,0.01%)的聚山梨酯-80;(d)(任选地)浓度为约0至约100mM,例如,100mM的甘氨酸;(e)(任选地)浓度为约0至约100mM,例如,100mM的甲硫氨酸;和(f)组氨酸缓冲剂(浓度约10mM至约20mM),或Tris缓冲剂(浓度约20mM),使得所述制剂的pH为约5至7.5,例如,5、5.5、5.8-6.1、6、6.1、6.5、或7。所述液体制剂可以存在于制品中,如带有使用说明的装置、注射器或小瓶。在一些实施方案中,所述注射器或小瓶由玻璃、塑料或聚合物材料构成,所述聚合物材料如环烯烃聚合物或共聚物。在其他实施方案中,所述制

剂可以存在于可注射装置中（例如，注射器，例如，预充式注射器）。所述注射器可适用于个体给药，例如，作为包括自我注射器（例如，笔型注射装置）和 / 或使用说明的单瓶系统。所述制剂可以通过在注射中向受试者（例如，患者）给药，例如，外周给药（例如，皮下，血管内、肌肉内或腹膜内给药）。

[0022] 在其他实施方案中，所述制剂是冻干制剂。在一个代表性实施方案中，所述冻干制剂包括 a) SDAB 分子，例如，纳米抗体分子（例如，TNF 结合性纳米抗体分子），其浓度为约 10 至约 150mg/mL，例如，约 25mg/mL，约 50mg/mL，约 80mg/mL，约 88mg/mL，约 100mg/mL，约 118mg/mL，约 130mg/mL；(b) 浓度为约 5% 至约 10%，例如，约 4% 至约 7%，例如，5% 的蔗糖；(c) 浓度为约，例如，0.01% 至 0.02%（例如，0.01%）的聚山梨酯-80；(d)（任选地）浓度为约 0 至约 100mM，例如，100mM 的甘氨酸；(e)（任选地）浓度为约 0 至约 100mM，例如，100mM 的甲硫氨酸；和 (f) 组氨酸缓冲剂（浓度约 10mM 至约 20mM，例如，约 20mM）或 Tris 缓冲剂（浓度约 20mM），从而使所述制剂的 pH 为约 5-7.5，例如，5、5.5、5.8-6.1、6、6.1、6.5 或 7。所述冻干制剂可以通过将冻干物 (lyophilate) 与合适的水性组合物混合来复原。

[0023] 在其他实施方案中，所述制剂为散装储存制剂。在一个代表性实施方案中，所述散装储存制剂包括 a) SDAB 分子，例如，纳米抗体分子（例如，TNF 结合性纳米抗体分子），其浓度为约 80mg/mL 至 300mg/mL，例如，约 150mg/mL，约 175mg/mL，约 200mg/mL，约 250mg/mL，约 275mg/mL，或约 300mg/mL；(b) 浓度为约 5% 至约 10%，例如，约 4% 至约 8%，例如，5%，或 7.5% 的蔗糖；(c) 浓度为约，例如，0.01% 至 0.02% 的聚山梨酯-80；(d)（任选地）浓度为约 0 至约 100mM，例如，100mM 的甘氨酸 (e)（任选地）浓度为约 0 至约 100mM，例如，100mM 的甲硫氨酸；和 (f) 组氨酸缓冲剂（浓度约 10mM 至约 20mM）或 Tris 缓冲剂（浓度约 20mM），从而使所述制剂的 pH 为约 5 至 7.5，例如，5、5.5、5.8-6.1、6、6.1、6.5 或 7。所述散装储存制剂可以是冷冻的。在一些实施方案中，所述散装储存制剂可以大规模制备，例如，超过 10 升，50 升，100、150、200 或更多升。

[0024] 在一些实施方案中，所述制剂的 SDAB 分子，例如，纳米抗体分子（例如，TNF 结合性纳米抗体分子），包含一个或多个单结合域（例如，一个或多个纳米抗体）。例如，所述纳米抗体分子可以包含，或其组成为：多肽，例如，单链多肽，其包含至少一个免疫球蛋白可变域（包括一个、两个或三个互补决定区 (CDR)）。SDAB 分子的例子包括天然不含轻链的分子（例如，VHH，纳米抗体，或骆驼科动物 (camelid) 来源的抗体）。这些 SDAB 分子可以源自或获得自骆驼科动物例如骆驼 (camel)、美洲驼 (llama)、单峰骆驼 (dromedary)、羊驼 (alpaca) 和原驼 (guanaco)。在其他实施方案中，所述 SDAB 分子可以包括单域分子，包括但不限于其他天然存在的单域分子，如鲨鱼单域多肽 (IgNAR)；和单域支架（例如，纤连蛋白支架）。单域分子可以源自鲨鱼。

[0025] 在一个实施方案中，所述制剂的 SDAB 分子是包含一个或多个单域分子的单链多肽。在多个实施方案中，所述纳米抗体分子是单价或多价的（例如，二价、三价或四价）。在其他实施方案中，所述纳米抗体分子是单一特异性或多重特异性的（例如，双重特异性、三重特异性或四重特异性）。所述 SDAB 分子可以包含一个或多个单域分子，所述单域分子为重组的、CDR 移植的、人源化的、骆驼源化的 (camelized)、去免疫化的、和 / 或体外生成的（例如，通过噬菌体展示选择的）。例如，所述 SDAB 分子可以是包含一个或多个单域分子的单链融合多肽，所述单域分子与一个或多个靶抗原结合。所述靶抗原通常为哺乳动物的蛋

白质,例如,人的蛋白质。在一些实施方案中,所述 SDAB 分子与血清蛋白结合,例如,选自血清白蛋白(人血清白蛋白(HSA))、纤维蛋白、纤维蛋白原或转铁蛋白中的一种或多种的人血清蛋白。

[0026] 在一个示例性实施方案中,所述制剂的 SDAB 分子是三价、双重特异性分子,由与靶抗原(例如,肿瘤坏死因子 α (TNF α))结合的两个单域分子(例如,两个骆驼科动物可变区)和一个与血清蛋白(例如,HSA)结合的单域分子(例如,骆驼科动物可变区)的单链多肽融合体构成。所述 SDAB 分子的单域分子从 N 端到 C 端可以按以下顺序排列:TNF α - 结合性单域分子 - HAS 结合性单域分子 - TNF α - 结合性单域分子。应理解针对一个或多个靶的单域分子的任何顺序或组合可以如文本所述配制。

[0027] 在一个实施方案中,所述制剂的 SDAB 分子在本文称作“ATN-103”,其包含或其组成为图 30 中所示的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) 或与其基本上相同的氨基酸序列(例如,相对于图 30 中所示的氨基酸序列至少 85%、90%、95%或更多相同的,或具有至多 20、15、10、5、4、3、2、1 个氨基酸改变(例如,缺失、插入或取代(例如,保守取代))的氨基酸序列)。能够如本文所述配制的其它三价、双重特异性纳米抗体分子的实例包括 TNF24、TNF25、TNF26、TNF27、TNF28、TNF60 和 TNF62,其公开于 WO 2006/122786 的表 29 中。

[0028] 在一些实施方案中,所述制剂的 SDAB 分子的单域分子中的至少一个与 TNF α 结合,其包括如下的一个、两个或三个 CDR:具有如下氨基酸序列: DYWMY (SEQ ID NO :2) (CDR1)、EINTNGLITKYPDSVKG (SEQ ID NO :3) (CDR2) 和/或 SPSGFN (SEQ ID NO :4) (CDR3),或具有与所述 CDR 之一的区别少于 3、2 或 1 个氨基酸取代(例如,保守取代)的 CDR。在其他实施方案中,所述单域分子包含具有图 30 的约氨基酸 1 至 115 的氨基酸序列,或与其基本上相同的氨基酸序列(例如,相对于图 30 中所示的氨基酸序列至少 85%、90%、95%或更多相同的,或具有至多 20、15、10、5、4、3、2、1 个氨基酸改变(例如,缺失、插入或取代(例如,保守取代))的氨基酸序列)的可变区。在多个实施方案中,所述 TNF α 结合性单域分子具有图 30 中所示的 TNF α 结合性单域抗体分子的一种或多种生物学活性。例如,所述 TNF α 结合性单域分子结合至与图 30 中所示的 TNF α 结合性单域分子识别的表位相同或相似的表位(例如,以其三聚体形式结合至 TNF α ;结合至接触 TNF 受体的 TNF α 位点;结合至包含第一 TNF 单体(单体 A)上位置 88 的 Gln 和位置 90 的 Lys 以及第二 TNF 单体(单体 B)上位置 146 的 Glu 的 TNF α 三聚体中的表位,或如 WO 06/122786 中公开的表位)。在其他实施方案中,所述 TNF α 结合性单域分子具有与 WO 06/122786 中公开的任何 TNF α 结合性单域分子类似的活性(例如,结合亲和力、解离常数、结合特异性、TNF-抑制性)。

[0029] 在其他实施方案中,所述 TNF α 结合性纳米抗体分子包含 WO 2006/122786 中公开的纳米抗体中的一个或多个。例如,所述 TNF α 结合性纳米抗体分子可以是 WO 2006/122786 中公开的单价、二价、三价 TNF α 结合性纳米抗体分子。示例性 TNF α 结合性纳米抗体包括但不限于 TNF1、TNF2、TNF3、其人源化形式(例如, TNF29、TNF30、TNF31、TNF32、TNF33)。单价 TNF α 结合性纳米抗体的其他实例公开于 WO 2006/122786 的表 8 中。示例性二价 TNF α 结合性纳米抗体分子包括但不限于 TNF55 和 TNF56,其包含两个通过肽接头(linker)连接的 TNF30 纳米抗体以形成单一融合多肽(公开于 WO 2006/122786)。二价 TNF α 结合性纳米抗体分子的其他实例作为 TNF4、TNF5、TNF6、TNF7、TNF8 公开于 WO 2006/122786 的表 19 中。

[0030] 在其他实施方案中,所述制剂的 SDAB 分子的单域分子中的至少一个与 HAS 结合,其包括如下的一个、两个或三个 CDR:具有如下氨基酸序列:SFGMS(SEQ ID NO:5)(CDR1)、SISGSGSDTLYADSVKG(SEQ ID NO:6)(CDR2)和/或 GGSLSR(SEQ ID NO:7)(CDR3),或具有与上述 CDR 之一的区别少于 3、2 或 1 个氨基酸取代(例如,保守取代)的 CDR。在其他实施方案中,所述单域分子包含可变区,所述可变区具有图 30(SEQ ID NO:1)的约氨基酸 125 至 239 的氨基酸序列,或与其基本上相同的氨基酸序列(例如,相对于图 30(SEQ ID NO:1)中所示的氨基酸序列至少 85%、90%、95%或更多相同的,或具有至多 20、15、10、5、4、3、2、1 个氨基酸改变(例如,缺失、插入或取代(例如,保守取代))的氨基酸序列)。在多个实施方案中,所述 HSA 结合性单域分子具有图 30(SEQ ID NO:1)中所示的 HSA 结合性单域分子的一种或多种生物学活性。例如,所述 HSA 结合性单域分子结合至与图 30(SEQ ID NO:1)中所示的 HSA 结合性单域分子识别的表位相同或相似的表位。在其他实施方案中,所述 HSA 结合性单域分子具有与 WO 06/122786 中公开的任何 HSA 结合性单域分子类似的活性(例如,结合亲和力、解离常数、结合特异性)。

[0031] 在其他实施方案中,所述 HSA 结合性 SDAB 分子包含 WO 2006/122786 中公开的纳米抗体中的一个或多个。例如,所述 HSA 结合性 SDAB 分子可以是 WO 2006/122786 中公开的单价、二价、三价 HSA 结合性纳米抗体分子。在其他实施方案中,所述 HAS 结合性 SDAB 分子可以是具有与 HAS 结合的结合特异性中至少一种的单一特异性或多重特异性分子。示例性 HSA 结合性纳米抗体包括但不限于 ALB1、其人源化形式(例如,ALB6、ALB7、ALB8、ALB9、ALB10),其公开于 WO 06/122786。

[0032] 在其他实施方案中,所述 SDAB 分子的两个或更多个单域分子用或不用连接基团融合成基因(genetic)或多肽融合物。所述连接基团可以是对于本领域技术人员显而易见的任何连接基团。例如,所述连接基团可以是长度为 1 至 100 个原子的生物相容性聚合物。在一个实施方案中,所述连接基团包括或其组成为聚甘氨酸、聚丝氨酸、聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚异亮氨酸或聚精氨酸残基,或其组合。例如,所述聚甘氨酸或聚丝氨酸接头可以包括至少五个、七个、八个、九个、十个、十二个、十五个、二十个、三十个、三十五个和四十个甘氨酸和丝氨酸残基。能够使用的示例性接头包括 Gly-Ser 重复序列,例如,以一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个重复的 $(\text{Gly})_4\text{-Ser}$ (SEQ ID NO:8) 重复序列。在多个实施方案中,所述接头具有以下序列: $(\text{Gly})_4\text{-Ser-(Gly)}_3\text{-Ser}$ (SEQ ID NO:9)或 $((\text{Gly})_4\text{-Ser})_n$ (SEQ ID NO:10),其中 n 是 4、5 或 6。

[0033] 本发明的制剂可以包括通过连接,例如共价或非共价连接第二模块而修饰的 SDAB 分子。例如,所述纳米抗体分子可以共价附接于合适的药理学可接受的聚合物,例如聚乙二醇(PEG)或其衍生物(例如甲氧基聚乙二醇或 mPEG)。聚乙二醇化的(pegylated)纳米抗体分子的实例作为 TNF55-PEG40、TNF55-PEG60、TNF56-PEG40 和 TNF56-PEG60 公开于 WO 06/122786。

[0034] 在另一实施方案中,本发明的制剂在约 2°C 至约 25°C(例如,约 4°C 或 25°C)的温度下稳定至少 3、6、9、12 个月(例如,至少 24、30、36 个月)。在一些实施方案中,所述 SDAB 分子的完整性在约 2°C 至约 25°C(例如,约 4°C 或 25°C)的温度下在储存于所述制剂中至少 3、6、9、12 个月(例如,至少 24、30、36 个月)后得到保持。例如,所述制剂中的 SDAB 分子在约 2°C 至约 25°C(例如,约 4°C 或 25°C)的温度下储存之后保持所述 SDAB 分子的生物学活

性（例如，结合活性）的至少 50%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或高达 100%。在一些实施方案中，所述制剂在约 2°C 至约 25°C（例如，约 4°C 或 25°C）的温度在所述制剂中储存至少 3、6、9、12 个月（例如，至少 24、30、36 个月）之后包含少于 10%、9%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少的高分子量 (HMW) 物质。在其他实施方案中，所述制剂在约 2°C 至约 25°C（例如，约 4°C 或 25°C）的温度，在所述制剂中储存至少 3、6、9、12 个月（例如，至少 24、30、36 个月）之后包含少于 10%、9%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少的低分子量 (LMW) 物质。还在其他实施方案中，所述制剂在约 2°C 至约 25°C（例如，约 4°C 或 25°C）的温度，在所述制剂中储存至少 3、6、9、12 个月（例如，至少 24、30、36 个月）之后包含少于 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少的酸性物质。还在其他实施方案中，所述制剂在约 2°C 至约 25°C（例如，约 4°C 或 25°C）的温度，在所述制剂中储存至少 3、6、9、12 个月（例如，至少 24、30、36 个月）之后包含少于 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少的碱性物质。所述制剂中的 HMW、LMW、酸性和碱性物质可以使用标准方法检测，例如体积排阻 - 高效液相色谱 (SEC-HPLC) 和如本文所述的类似方法。

[0035] 在一些实施方案中，在复原冻干 SDAB 制剂时，所述制剂与冻干之前的制剂相比保留至少 80%、90%、95% 或更高的 SDAB 结构。SDAB 结构，通过例如结合测定法、生物测定法或 HMW 物质与 LMW 物质的比例来测定。

[0036] 本发明的制剂还可以包括第二药剂，例如，在治疗 TNF- α 相关病症，例如，炎症病症或自身免疫病症，包括但不限于类风湿性关节炎 (RA)（例如，中度至重度类风湿性关节炎），关节炎性病状（例如，银屑病关节炎 (psoriatic arthritis)，多关节型幼年特发性关节炎 (polyarticular juvenile idiopathic arthritis) (JIA)、强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis) (AS)、银屑病、溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis)、克罗恩氏病、炎症肠疾病和 / 或多发性硬化中有用的第二治疗或药理活性剂。例如，所述第二药剂可以是抗 TNF 抗体或其 TNF 结合性片段，其中所述第二 TNF 抗体与不同于所述制剂的 TNF 结合性 SDAB 分子的表位结合。能够与所述 TNF 结合性 SDAB 分子共同配制的药剂的其他非限定性实例包括但不限于，细胞因子抑制剂、生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、细胞毒性剂和细胞抑制剂。在一个实施方案中，所述额外的药剂是关节炎的标准治疗法，包括但不限于，非甾体抗炎剂 (NSAID)；皮质类固醇，包括泼尼松龙 (prednisolone)，泼尼松 (prednisone)，可的松 (cortisone) 和曲安西龙 (triamcinolone)；和疾病改善性抗风湿药物 (DMARD)，如甲氨蝶呤 (methotrexate)，羟氯喹 (hydroxychloroquine) (Plaquenil) 和柳氮磺吡啶 (sulfasalazine)，来氟米特 (leflunomide) (**Arava®**)，肿瘤坏死因子抑制剂，包括伊纳西普 (etanercept) (**Enbrel®**)，英夫利昔单抗 (infliximab) (**Remicade®**)（含或不含甲氨蝶呤），和阿达木单抗 (adalimumab) (**Humira®**)，抗 CD20 抗体（例如，**Rituxan®**），可溶性白介素 1 受体，如阿那白滞素 (**Kineret®**)，金，米诺环素 (minocycline) (**Minocin®**)，青霉胺 (penicillamine)，和细胞毒性剂，包括硫唑嘌呤 (azathioprine)，环磷酰胺 (cyclophosphamide)，和环孢霉素 (cyclosporine)。有利地，这些组合治疗可以使用较低剂量的所给药的治疗剂，由此避免与多种单一治疗相关的可能的毒性或并发症。

[0037] 赋形剂和 / 或第二治疗剂的可选组合可遵循本文提供的指导来鉴定和测试。

[0038] 在另一实施方案中，本文描述的制剂适合用于向受试者，例如，人受试者（例如，

患有 TNF α 相关病症的患者) 给药。所述制剂可以通过注射(例如,皮下、血管内、肌肉内或腹膜内)或通过吸入向所述受试者给药。

[0039] 在另一个方面,本发明描述了制备本文所述的制剂的方法或工艺。所述方法或工艺包括:在细胞培养中表达所述 SDAB 分子;纯化所述 SDAB 分子,例如,通过使所述 SDAB 分子通过色谱纯化步骤、超滤/渗滤步骤中的至少一种;调制剂剂中 SDAB 分子的浓度,例如,调节至约 10 至 250mg/mL,所述制剂含有如本文所述的冻干保护剂、表面活性剂和缓冲剂,例如,浓度为约 5%至约 10%,例如,约 5%,约 10%的蔗糖;浓度为约 0 至约 0.02%,例如,0.01%,0.02%的聚山梨酯-80;(任选地)浓度为约 0 至约 100mM,例如,100mM 的甘氨酸;(任选地)浓度为约 0 至约 100mM,例如,100mM 的甲硫氨酸;和(f) 组氨酸(浓度约 10 至约 20mM)或 Tris 缓冲剂(浓度约 20mM),使得所述制剂的 pH 为约 5 至 7.5,例如,5、5.5、5.8-6.1、6、6.1、6.5 或 7。

[0040] 在另一个方面,本发明描述了制备如本文所述的含有 SDAB 分子,例如, TNF 结合性 SDAB 分子的复原制剂的方法或工艺。所述方法包括:冻干 SDAB 分子、冻干保护剂、表面活性剂和缓冲剂的混合物,由此形成冻干混合物;和在稀释剂中复原所述冻干混合物,由此制备如本文所述的制剂。在一个实施方案中,所述制剂包括(a) SDAB 分子,例如, TNF 结合性纳米抗体分子,其浓度为约 0.5 至约 200mg/mL,例如,约 1mg/mL,约 50mg/mL,约 80mg/mL,约 88mg/mL,约 100mg/mL,约 118mg/mL;(b) 浓度为约 5%至约 10%,例如,约 5%,约 10%的蔗糖;(c) 浓度为约 0 至约 0.02%,例如,0.01%,0.02%的聚山梨酯-80;(d) (任选地)浓度为约 0 至约 100mM,例如,100mM 的甘氨酸;(e) (任选地)浓度为约 0 至约 100mM,例如,100mM 的甲硫氨酸;和(f) 组氨酸(浓度约 10 至约 20mM)或 Tris 缓冲剂(浓度约 20mM),使得所述制剂的 pH 为约 5 至 7.5,例如,5、5.5、5.8-6.1、6、6.1、6.5 或 7。

[0041] 在另一个方面,本发明涉及用于治疗或预防受试者(例如,人受试者)中 TNF α 相关病症的方法,所述病症例如,炎症病症或自身免疫病症,包括但不限于,类风湿性关节炎(RA)(例如,中度至重度类风湿性关节炎),关节炎性病状(例如,银屑病关节炎、多关节型幼年特发性关节炎(JIA)、强直性脊柱炎(AS)、银屑病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、炎症肠疾病和/或多发性硬化。所述方法包括以使 TNF α 相关病症的一种或多种症状减少的量单独或与任何本文所述的组合治疗组合向受试者,例如人受试者,给药药物组合物,所述药物组合物包括如本文所述的 TNF 结合性 SDAB 制剂,例如,含有 TNF 结合性 SDAB 分子的制剂。

[0042] 在另一个方面,本发明描述了包括含有本文描述的制剂的装置、注射器或小瓶的试剂盒或制品。所述试剂盒或制品可以任选地包括使用说明书。在一些实施方案中,所述注射器或小瓶由玻璃、塑料或聚合物材料如环烯烃聚合物或共聚物构成。在其他实施方案中,所述制剂可以存在于注射装置中(例如,注射器,例如,预充式注射器)。所述注射器可以适用于个体给药,例如,作为包括自我注射器(autoinjector)(例如,笔型注射装置)和/或使用说明的单瓶系统。在一个实施方案中,所述注射装置为预充式笔或其他合适的自我注射装置,任选地带有对使用和给药的说明。

[0043] 在一些实施方案中,向受试者,例如,患者或护理提供者提供所述试剂盒或制品(例如,带有单个或多个剂量单位的预充式笔或注射器),其预先包装有对通过注射(例如,皮下、血管内、肌肉内或腹膜内)进行给药(例如,自我给药)的说明。

[0044] 在其他实施方案中,本发明描述了用于鼻部、经皮、静脉内给药本文描述的制剂的

装置。例如,提供了用于给药本文描述的制剂的经皮贴片。而在其他情况下,提供了用于给药本文描述的制剂的静脉输液包 (intravenous bag)。在多个实施方案中,所述静脉输液包提供有生理盐水或 5% 右旋糖。

[0045] 在另一个方面,本发明描述了指导需要 SDAB 分子,例如, TNF α 纳米抗体分子的患者 (例如, 人患者) 如何给药本文描述的制剂的方法。所述方法包括: (i) 提供给患者至少一个单位剂量的本文描述的 SDAB 分子的制剂; 和 (ii) 指导所述患者自我给药所述至少一个单位剂量, 例如, 通过注射 (例如, 皮下、血管内、肌肉内或腹膜内)。在一个实施方案中, 所述患者患有 TNF α 相关病症, 例如, 如本文所述的炎症病症或自身免疫病症。

[0046] 在另一个方面, 本发明描述了指导接受者给药本文所述的 TNF α 纳米抗体分子的制剂的方法。所述方法包括指导所述接受者 (例如, 最终用户, 患者, 医生, 零售或批发药房, 经销商, 或医院、疗养院诊所或 HMO 的药房) 所述制剂应该如何向患者给药。

[0047] 在另一个方面, 提供了分配本文所述的 SDAB 分子的制剂, 例如 TNF α 纳米抗体分子的制剂的方法。所述方法包括为接受者 (例如, 最终用户, 患者, 医生, 零售或批发药房, 经销商, 或医院、疗养院诊所或 HMO 的药房) 提供含有充足单位剂量的 SDAB 分子, 例如, TNF α 纳米抗体分子的包装, 以治疗患者至少 6、12、24 或 36 个月。

[0048] 在另一个方面, 本发明描述了评估含有 SDAB 分子, 例如, TNF α 纳米抗体分子的本文描述的制剂的一个包装或多个包装的质量的方法或工艺 (例如, 以测定其是否失效)。所述方法包括评估所述包装是否失效。有效期 (expiration date) 自预先选择的事件 (如制造、测定或包装) 起至少为 6、12、24、36 或 48 个月, 例如, 多于 24 或 36 个月。在一些实施方案中, 因所述分析而做出决定或采取步骤, 例如, 对包装中的 SDAB 分子进行使用或丢弃、分类、选择、发放或扣留、运输、转移至新地点、上市 (release into commerce)、销售 (sale)、或许诺销售 (offer for sale)、退市 (withdraw from commerce) 或不再许诺销售, 其依赖于所述产品是否失效。

[0049] 在另一个方面, 本发明描述了储存、分配或使用本文所述的 SDAB 分子, 例如, TNF 纳米抗体分子的制剂的方法。所述方法包括: 在给定的温度, 例如, 低于 25°C, 例如, 低于冰点或低于 15°C、10°C 或 4°C 储存所述制剂一段时间。在多个实施方案中, 所述方法还包括向接受者, 例如, 最终用户, 例如, 患者或护理提供者, 提供所述制剂, 以供在相似的或不同的条件 (例如, 比第一储存期高的温度) 下储存。所述制剂可以是液体的、冻干的或复原的制剂。

[0050] 在另一个方面, 本发明描述了分析产品或工艺 (例如, 制造工艺) 的方法。所述方法包括提供如本文所述的 SDAB 分子, 例如, TNF 纳米抗体分子的制剂, 并评价所述制剂的参数, 例如颜色 (例如, 无色至稍黄, 或无色至黄色), 澄清度 (例如, 澄清至稍有乳白色光 (slightly opalescent) 或澄清至发乳白色光), 或粘度 (例如, 当在环境温度如 20°C - 30°C, 例如, 25°C 下测量时约 1 至 5cP 之间), 一种或多种 HMW、LMW、酸性和 / 或碱性物质的量, 如本文所述。所述评估可以包括对一个或多个参数的评价。任选地, 测定所述参数是否满足预先选择的标准, 例如, 测定是否出现所述预先选择的标准, 或是否存在于预先选择的范围内, 由此分析该工艺。

[0051] 在一个实施方案中, 对工艺的评估包括对所述 SDAB 分子制剂稳定性的测量。所述抗体制剂的稳定性的测量可以例如通过聚集体形成进行, 所述聚集体形成通过例如体积

排阻高压液相色谱 (SE-HPLC), 通过如本文所述的颜色、澄清度或粘度来测定。如果历经预设的时间段, 并任选地在给定的温度下, 测定参数的变化小于约 10%、5%、3%、2%、1%、0.5%、0.05%、或 0.005% 或更少, 那么制剂可被测定为稳定的, 并因此对于进一步的加工或分配是可以接受的。

[0052] 在一个实施方案中, 所述方法还包括比较测定值与参照值, 由此分析所述制造工艺。

[0053] 在一个实施方案中, 所述方法还包括至少部分基于所述分析维持所述制造工艺。在一个实施方案中, 所述方法还包括基于所述分析改变所述制造工艺。

[0054] 在另一实施方案中, 所述方法包括评估通过选择的工艺制成的 SDAB 分子, 例如, TNF 纳米抗体分子的制剂的工艺, 例如, 制造工艺, 其包括基于本文所述的方法或分析做出关于所述工艺的决定。在一个实施方案中, 所述方法还包括至少部分基于所述方法或分析而维持或改变所述制造工艺。由此, 在另一实施方案中, 做出评估的一方不实施本文描述的方法或分析, 而仅依赖于通过本文描述的方法或分析获得的结果。

[0055] 在另一实施方案中, 所述方法包括在监控或控制批次间变化的方法中比较两种或更多种制备物或将制备物与参照标准比较。

[0056] 在另一实施方案中, 所述方法可进一步包括做出决定以至少部分基于所述决定来例如分类、选择、接受或丢弃、发放或扣留、加工成药物产品、运输、转移至不同地点、配制、贴标、包装、上市、销售或许可销售所述制备物。

[0057] 在另一个方面, 本发明描述了评估如本文所述的 SDAB 分子, 例如, TNF 纳米抗体分子的制剂质量的方法, 例如, 在质量控制或发布规范分析 (release specification analysis) 中。所述方法包括提供对 SDAB 分子制剂的参数的评估, 所述参数例如颜色 (例如, 无色至稍黄, 或无色至黄色), 澄清度 (例如, 澄清至稍有乳白色光 (slightly opalescent) 或澄清至发乳白色光), 或粘度 (例如, 当在环境温度如 20°C -30°C, 例如, 25°C 下测量时约 1 至 5cP 之间)。所述评估可以包括对一种或多种上述参数的评价。所述方法还任选地包括测定所述溶液参数是否满足预先选择的标准, 例如, 该预先选择的标准是否存在, 或是否存在于预先选择的范围内。如果观察到的溶液参数在预先选择的数值范围内, 或满足预先选择的标准, 那么选择所述制备物, 例如, 用于包装、使用、销售、上市、丢弃等。

[0058] 在另一个方面, 本发明描述了符合监管要求的方法, 所述监管要求例如, 监管机构例如 FDA 的批准后要求 (post approval requirement)。所述方法包括提供对抗体制剂参数的评估, 如本文所述。所述批准后要求可以包括对一种或多种上述参数的测量。所述方法还任选地包括测定观察到的溶液参数是否符合预先选择的标准, 或者所述参数是否在预先选择的范围内; 任选地, 记录分析的数值或结果, 或与所述机构沟通, 例如, 通过将该数值或结果传送给所述监管机构。

[0059] 在另一个方面, 本发明描述了制备具有预先选择的性质, 例如, 满足发布规范、标签要求或药典要求, 例如, 本文描述的性质的性质的一批 SDAB 分子, 例如 TNF 纳米抗体分子的制剂。所述方法包括提供测试制剂; 根据本文描述的方法分析所述测试制剂; 测定所述测试制剂是否满足预先选择的标准, 例如, 与参照值 (例如, 一种或多种本文公开的参照值) 是否具有预先选择的关系, 并选择所述测试抗体制备物来制备一批产品。

[0060] 在另一个方面,本发明描述了多个批次的 SDAB 分子,例如,TNF 纳米抗体分子的制剂,其中各个批次的一种或多种参数(例如,通过本文描述的方法测定的数值或溶液参数)相对于预先选择的期望参照值或标准(例如,本文描述的范围或标准)的变化小于预先选择的范围。在一些实施方案中,测定一个或多个批次的制剂的一种或多种参数,并且根据所述测定选择一个批次或多个批次。一些实施方案包括将所述测定的结果与预先选择的数值或标准,例如,参照标准进行比较。其他实施方案包括调整待给药的批次的剂量,例如,基于对所述数值或参数的测定结果。

[0061] 在另一个方面,本发明描述了下述一项或多项的方法:向报告接收机构提供报告,评估 SDAB 分子,例如,TNF 纳米抗体分子的制剂样品对参照标准(例如,FDA 要求)的符合情况,从另一方寻求 SDAB 分子制备物满足一些预先确定的要求的指示,或向另一方提交关于 SDAB 分子制备物的信息。示例性接收机构或另一方包括政府,例如,美国联邦政府,例如,政府机构,例如,FDA。所述方法包括以下步骤中的一步或多步(或全部):在第一国,例如,美国,制备和/或测试 SDAB 分子的水性制剂;将样品的至少一个等分试样发送到第一国之外,例如,将其发送到美国之外,给第二国;准备或接收包括有关所述 SDAB 分子制备物的结构的数据的报告,所述数据例如与本文所述的结构和/或链有关的数据,例如,通过本文描述的一种或多种方法生成的数据;和向报告接收结构提供所述报告。

[0062] 在一个实施方案中,所述报告接收机构能够确定所述数据是否满足预先决定的要求或参照值,并且任选地,例如,由所述 SDAB 分子制剂的制造商、经销商(distributor)或销售商(seller)从所述报告接收机构收到回复。在一个实施方案中,在从报告接收机构收到批准之后,将 SDAB 分子制剂的制备物进行选择、包装或上市。

[0063] 在另一个方面,本发明描述了评估 SDAB 分子制剂的方法。所述方法包括接收关于 SDAB 分子的存在或水平的数据,例如,其中所述数据由本文描述的一种或多种方法所准备;提供包括所述数据并任选包括一批 SDAB 分子的标识(identifier)的记录;将所述记录提交给决策机构,例如,政府机构,例如,FDA;任选地,收到所述决策机构的联络;任选地,基于来自所述决策机构的联络内容决定是否发放或销售该批 SDAB 分子。在一个实施方案中,所述方法还包括发放所述样品。

[0064] 本文提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过提述以其整体并入。

[0065] 除非另有限定,否则本文使用的全部技术和科学术语具有与本发明所属技术领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文描述的方法和材料类似或等效的那些可以用于实践或检验本发明,在下文描述合适的方法和材料。另外,所述材料、方法和实例仅是说明性的而无作为限定性的意图。

[0066] 本发明的其他特征和优势会通过详述、附图和权利要求书而凸显。

附图说明

[0067] 图 1 描绘了作为干粉(DP)制备物储存长达六个月的 10^6 U/mg TNF 结合性纳米抗体(ATN-103)的冻干制剂的生物学活性结果。所述制剂储存在标示的温度下。

[0068] 图 2 描绘了 TNF 结合性纳米抗体(ATN-103)冻干制剂的人血清白蛋白(HSA)结合活性的结果。所述结果作为占 TNF 结合性纳米抗体参照标准的百分比(%)显示。

[0069] 图 3 描绘了冻干制剂在高分子量(HMW)物质的%方面的体积排阻-HPLC(SE-HPLC)

的结果。

[0070] 图 4 描绘了冻干制剂在 TNF 结合性纳米抗体百分数 (%) 方面的 SDS- 毛细管电泳 (SDS-CE) 的结果。

[0071] 图 5 描绘了对于经受对照和鲁棒性 (robustness) 冻干循环的制剂的 HMW 物质百分数 (%) 的 SE-HPLC 结果。

[0072] 图 6 描绘了在以高浓度液体制剂储存长达六个月之后 10^6 U/mg TNF 结合性纳米抗体的生物学活性结果。

[0073] 图 7 描绘了在标示温度储存长达六个月的高浓度液体制剂的人血清白蛋白 (HSA) 结合活性结果 (占 TNF 结合性纳米抗体参照标准的百分数)。

[0074] 图 8 描绘了在标示温度储存长达六个月之后对于高浓度液体制剂的 HMW 物质百分数 (%) 的 SE-HPLC 结果。

[0075] 图 9 描绘了在标示温度储存长达六个月之后对于高浓度液体制剂的 % LMW 物质的 SE-HPLC 结果。

[0076] 图 10 描绘了在标示温度下储存长达六个月之后对于高浓度液体制剂的 ATN-103 百分数 (%) 的 SDS-CE 结果。

[0077] 图 11 描绘了对于预充式注射器中高浓度液体制剂的 HMW 物质百分数 (%) 的 SE-HPLC 结果。

[0078] 图 12 描绘了对于预充式注射器中高浓度液体制剂的 LMW 物质百分数 (%) 的 SE-HPLC 结果。

[0079] 图 13 描绘了对于预充式注射器中高浓度液体制剂的酸性物质百分数 (%) 的 CEX-HPLC 结果。

[0080] 图 14 描绘了对于预充式注射器中高浓度液体制剂的碱性物质百分数 (%) 的 CEX-HPLC 结果。

[0081] 图 15 描绘了对于高浓度液体制剂 - 其他制剂的 HMW 物质百分数 (%) 的 SE-HPLC 结果 (对其他稳定化和去稳定化赋形剂的鉴定)。

[0082] 图 16 描绘了对于 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的 HMW 物质百分数 (%) 的 SE-HPLC 结果。

[0083] 图 17 描绘了对于 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的 LMW 物质百分数 (%) 的 SE-HPLC 结果。

[0084] 图 18 描绘了对于 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的酸性物质百分数 (%) 的 CEX-HPLC 结果。

[0085] 图 19 描绘了对于 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的碱性物质百分数 (%) 的 CEX-HPLC 结果。

[0086] 图 20 描绘了在 10X 冻 - 融循环之后对于 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的 HMW 物质百分数 (%) 的 SE-HPLC 结果。

[0087] 图 21 描绘了在 10X 冻 - 融循环之后对于 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的 LMW 物质百分数 (%) 的 SE-HPLC 结果。

[0088] 图 22 描绘了在 10X 冻 - 融循环之后对于 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的浊度 (455nm 的吸光度) 结果。

[0089] 图 23 描绘了在 10X 冻 - 融循环之后对于 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的浓度（通过在 280nm 的 UV 吸光度）结果。

[0090] 图 24 描绘了 TNF 结合性纳米抗体的高浓度液体制剂在制造工艺中可能遇到的短期热应激之后通过 SE-HPLC 的 HMW 百分数（%）。

[0091] 图 25 描绘了对于低浓度液体制剂的 HMW 物质百分数（%）的 SE-HPLC 结果作为 pH 和制剂的函数（40℃）。

[0092] 图 26 描绘了对于低浓度液体制剂的 LMW 物质百分数（%）的 SE-HPLC 结果作为 pH 和制剂的函数（40℃）。

[0093] 图 27 描绘了对于低浓度液体制剂的 HMW 物质百分数（%）的 SE-HPLC 结果作为 pH 和制剂的函数（4℃）。

[0094] 图 28 描绘了在振荡之后对于低浓度液体制剂的 HMW 物质百分数（%）的 SE-HPLC 结果作为 pH 和制剂的函数。

[0095] 图 29 描绘了预测的 ATN-103 结构的示意图。

[0096] 图 30 描绘了 ATN-103 多肽链 (SEQ ID NO :1) 的氨基酸序列。

[0097] 图 31 是描绘在指示条件下储存的含有约 100mg/ml ATN-103 (HST、HSGT、HSGMT、HSorb 和对照) 的指示制剂通过 SE-HPLC 检测的 HMW 物质的 % 的柱状图。

[0098] 图 32 是描绘在指示条件下储存的含有约 100mg/ml ATN-103 (HST、HSGT、HSGMT、HSorb 和对照) 的指示制剂通过 SE-HPLC 检测的 LMW 物质的 % 的柱状图。在最初的时间点或在 4℃ 两周之后没有检测到 LMW 物质。

[0099] 发明详述

[0100] 包括 SDAB 分子,例如,纳米抗体分子(例如,TNF 结合性纳米抗体分子)的稳定制剂已经过鉴定适合于储存高浓度和低浓度的 SDAB 分子(“制剂”)。配制的 SDAB 分子优选是基本上纯的(essentially pure),并且理想的是基本上均质的(即不含污染性蛋白等)。“基本上纯的”蛋白质意指基于组合物的总重量,按重量计包含至少约 90% (优选按重量计至少约 95%) 的蛋白质的组合物。“基本上均质的”蛋白质意指基于组合物的总重量,按重量计包含至少约 99% 的蛋白质的组合物。

[0101] 制剂中 SDAB 分子的完整性在作为液体或作为冻干产品在不同条件下长期储存后通常得到保持。例如,所述 SDAB 分子的完整性在暴露于范围较宽的储存温度(例如,-80℃ 至 40℃)、剪切应力(例如,振荡)和界面应力(冻 - 融循环)之后得到充分保持。

[0102] 另外,对于冻干材料,SDAB 分子的完整性在复原过程中得到充分保持。另外,SDAB 分子完整性对于作为药物使用得到充分保持,如通过在不同温度(例如,-80℃ 至 40℃)下长期储存(例如,长达 12 个月)后相对低的 LMW 物质和 HMW 物质的积累、体外生物活性、体外结合活性所展现的。

[0103] 为了使本发明可以更容易理解,首先定义一些术语。其他定义在详述的通篇中阐述。

[0104] 如用于本文,冠词“一个”和“一种”指一个 / 多个或指一种 / 多种(例如,指至少一个 / 一种)该冠词的语法对象。

[0105] 术语“或”用于本文意指术语“和 / 或”并且与术语“和 / 或”可以互换使用,除非上下文明确地指出其他情况。

[0106] 术语“蛋白 / 蛋白质”和“多肽”在本文可以互换使用。

[0107] “约”和“大约”应通常意指鉴于测量的性质或精确度产生的所测量量的可接受程度的误差。示例性误差程度通常为给定数值或数值范围的百分之二十 (20%) 之内, 10% 之内, 并且更通常为 5% 之内。

[0108] SDAB 分子的“稳定”制剂经过长时间 (例如, 6 个、12 个月、24 个月、36 个月或更长) 之后, 几乎不展现聚集、碎裂、脱酰胺化、氧化或生物活性变化中的任何一种或多种, 或没有这些迹象。例如, 在一个实施方案中, 少于 10% 的 SDAB 分子是聚集的、碎裂的或氧化的。聚集、沉淀和 / 或变性可以通过已知方法评估, 例如对颜色和 / 或澄清度的视觉检查, 或通过紫外光散射或体积排阻色谱。蛋白质保持其生物活性的能力能够通过检测和定量抗体的化学变化形式来评估。例如, 尺寸修饰 (例如, 剪裁 (clipping)) 可以使用体积排阻色谱和 / 或 SDS-PAGE 来评估。其他类型的化学变化包括电荷变化 (例如, 因脱酰胺化而发生), 其能够通过例如离子交换色谱来评估。

[0109] 如果 SDAB 分子在给定时间处的生物活性是药物制剂制备时所展现的生物活性的约 50% 或更高, 如在例如抗原结合测定法中所测定的, 那么该 SDAB 分子在药物制剂中“保持其生物活性”。

[0110] “复原”制剂是一种通过将冻干的蛋白质制剂溶解在稀释剂中从而使所述蛋白质分散在复原制剂中而制备的制剂。所述复原制剂适合于向待治疗的患者给药 (例如胃肠外或外周给药) 感兴趣的蛋白质, 并且在本发明的一些实施方案中, 可以是一种适合于皮下给药的制剂。

[0111] “等张”或“等渗”意指感兴趣的制剂与人血具有相似或基本上相同的渗透压。等张或等渗制剂通常会具有约 250 至 350mOsm 的渗透压。等张性可以使用例如蒸汽压或冰冻型渗透压计来测量。

[0112] “张度调节剂”是指使制剂基本上与人血等张或等渗的化合物。示例性张度调节剂为: 蔗糖、山梨糖醇、甘氨酸、甲硫氨酸、甘露醇、右旋糖、肌醇、氯化钠、精氨酸或盐酸精氨酸。通常, 张度调节剂以使整个制剂产生与人血类似的渗透力 (osmotic strength) 的量添加。例如, 人血含有约 300mM 溶质。通常, 药物产品以 300mM 的总摩尔浓度为目标。这对应于约 300 至 310mOsm 的渗透压, 其通常的范围在 250mOsm 至 350mOsm。所需的张度调节剂的量最开始可以通过计算来估计。对总摩尔浓度的贡献可以从赋形剂分子的分子重量和分子的已知性质来估计, 例如所述分子是否解离成两个离子成分, 或所述分子是否为非离子的 (不解离)。另外, 必需理解特定蛋白质分子的渗透贡献是蛋白质浓度的函数。此参数能够通过实验测定。

[0113] 例如, 以 10mM 组氨酸、5% 蔗糖、0.01% 聚山梨酯 80 和 100mg/mL 的抗 TNF 纳米抗体蛋白浓度的制剂 (未修正张度) 开始, 作为第一步, 该初始制剂的估计摩尔浓度可以如下计算:

[0114] 10mM 组氨酸 = 10mM

[0115] 5% 蔗糖对应于约 146mM

[0116] $5\% = 5\text{g}/100\text{mL} = 50\text{g}/\text{L} \rightarrow (50\text{g}/\text{L}) / (342.3\text{g}/\text{mol}) = 0.146\text{mol}/\text{L} = 146\text{mM}$

[0117] 0.01% 聚山梨酯 80 产生的摩尔浓度基本为 0 而可以不考虑。

[0118] 100mg/mL 蛋白质: 已通过实验测定了 100mg/mL 抗 TNF 纳米抗体蛋白产生对应于

约 48mM 的渗透压。

[0119] 因此,将初始制剂中对摩尔浓度的所有贡献加和:

[0120] $10\text{mM}+146\text{mM}+48\text{mM} = 204\text{mM}$

[0121] 如果目标摩尔浓度为 310mM,那么补足该目标的余量的对应量摩尔浓度为:

[0122] $310\text{mM}-204\text{mM} = 106\text{mM}$

[0123] 因此,张度调节剂的推荐量为 106mM 的非离子型张度调节剂,或 53mM 的完全解离成两个离子成分的离子型张度调节剂。

[0124] 在决定了对张度调节剂的初步估计之后,推荐通过实验测试该制剂。因此,在提供的实例中,向初始制剂加入 100mM 甘氨酸。(方便起见,将推荐的 106mM 约减为 100mM)。期望的摩尔渗透压浓度则会为:

[0125] 10mM 组氨酸 + 146mM 蔗糖 + 48mM 蛋白质 + 100mM 甘氨酸 = 304mM

[0126] 所述制剂的渗透压实验值 = 305mOsm 。

[0127] “冻干保护剂”是当与感兴趣的蛋白质组合时显著防止或降低所述蛋白质在冻干和后续储存时的化学和 / 或物理不稳定性的分子。示例性冻干保护剂包括糖类,如蔗糖、山梨糖醇或海藻糖;氨基酸,如谷氨酸一钠或组氨酸;甲胺如甜菜碱;易溶的盐如硫酸镁;多元醇如三元或更高级的糖醇,例如丙三醇、赤藓糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇;丙二醇;聚乙二醇;Pluronic;和它们的组合。通常,冻干保护剂是非还原糖,如海藻糖或蔗糖。以“冻干保护量”将冻干保护剂加入预冻干的制剂,意思是在所述冻干保护量的冻干保护剂存在下冻干所述蛋白质之后,所述蛋白质在冻干和储存时基本上保留其物理和化学稳定性和完整性。

[0128] “稳定剂”是指当与感兴趣的蛋白质(例如,SDAB 分子)组合时基本上防止或减少所述感兴趣的蛋白质在冻干、复原、液体或储存形式中的化学和 / 或物理不稳定性的分子。示例性稳定剂包括蔗糖、山梨糖醇、甘氨酸、肌醇、氯化钠、甲硫氨酸、精氨酸和盐酸精氨酸。

[0129] 本文感兴趣的“稀释剂”是药学上可接受的(对于人体给药安全且无毒的)并且可用于复原制剂的制备的稀释剂。示例性稀释剂包括无菌水、注射用抑菌水(BWFI)、pH 缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格液或右旋糖溶液。

[0130] “防腐剂”是能够添加至稀释剂以基本上减少复原制剂中的细菌作用,从而例如有助于多用途复原制剂的生产的化合物。潜在防腐剂的实例包括十八烷基二甲基苄基氯化铵(octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride),氯化六甲双胺(hexamethonium chloride),苯扎氯铵(benzalkonium chloride)(烷基苄基二甲基氯化铵的混合物,其中烷基为长链化合物),和苄索氯铵(benzethonium chloride)。其他类型的防腐剂包括芳族醇如苯酚、丁醇和苯甲醇,对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲基酯或对羟基苯甲酸丙基酯,儿茶酚,间苯二酚,环己醇,3-戊醇和间甲酚。本文最优选的防腐剂是苯甲醇。

[0131] “填充剂”是为冻干混合物增加质量并对冻干饼的物理结构有所贡献(例如有助于保持开孔结构的基本上均一的冻干饼的产生)的化合物。示例性填充剂包括甘露醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨醇(xorbitol)。

[0132] 本发明的方法和组合物包括具有指定序列或与其基本上相同或相似的序列(例如,与该指定序列至少 85%、90%、95% 相同或更多相同的序列)的多肽和核酸。就氨基酸序列而言,术语“基本上相同”用于本文是指第一氨基酸含有足够或最低数量的氨基酸残

基,所述氨基酸残基与第二氨基酸序列中对齐的氨基酸残基 i) 相同,或 ii) 为其保守取代,从而使所述第一和第二氨基酸序列能够具有共有结构域和 / 或共有功能活性。例如,含有共有结构域的氨基酸序列与参照序列具有至少约 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性。在其他实施方案中,所述氨基酸序列可以含有一个或多个氨基酸插入、缺失或取代(例如,保守取代)以达到与参照序列具有至少约 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的百分比同一性。

[0133] 就核苷酸序列而言,术语“基本上相同”用于本文是指第一核酸序列含有足够或最少数量的与第二核酸序列中对齐核苷酸相同的核苷酸,从而使所述第一和第二核苷酸序列编码具有共有功能活性的多肽或编码共有的多肽结构域或共有的多肽功能活性。例如,核苷酸序列与参照序列具有至少约 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性。

[0134] 本发明的多肽还包括前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体,和他们的任何组合。术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”在涉及本发明的蛋白质时包括任何至少保留了对应天然抗体或多肽的一些功能性质的多肽。本发明的多肽片段除了在本文他处讨论的特定抗体片段之外,还包括蛋白水解片段,以及缺失片段。本发明的多肽的变体包括如上所述的片段,还包括因氨基酸取代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。变体可以天然存在或者可以是非天然存在的。非天然存在的变体可以使用领域内已知的诱变技术产生。变体多肽可以包含保守或非保守的氨基酸取代、缺失或添加。本发明的片段的衍生物是经过改变因而展现额外的不存在于天然多肽上的特性的多肽。实例包括融合蛋白。变体多肽在本文也可称作“多肽类似物”。如用于本文,多肽的“衍生物”是指具有一个或多个通过功能性侧基反应而化学衍生的残基的题述多肽。“衍生物”还包括那些含有一个或多个的二十个标准氨基酸天然存在的氨基酸衍生物的多肽。例如,4-羟脯氨酸可以取代脯氨酸;5-羟赖氨酸可以取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可以取代组氨酸;高丝氨酸可以取代丝氨酸;以及鸟氨酸可以取代赖氨酸。

[0135] 术语“功能性变体”是指具有与天然存在的序列基本上相同的氨基酸序列,或由基本上相同的核苷酸序列编码并且能够具有天然存在的序列的一种或多种活性的多肽。

[0136] 序列之间的同源性或序列同一性(在本文这两个术语可互换使用)的计算如下进行。

[0137] 为了测定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性,出于最佳比较的目的比对序列(例如,为了最佳比对可以在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或二者中引入缺口,且非同源性序列可以为了比较目的而不加以考虑)。在优选的实施方案中,为比较目的比对的(aligned)参照序列的长度是参照序列长度的至少 30%,优选至少 40%,更优选至少 50%、60%,并且甚至更优选至少 70%、80%、90%、100%。然后比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的某个位置由与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,那么所述分子在该位置是相同的(如用于本文,氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。

[0138] 两个序列之间的百分比同一性是在考虑了为了所述两个序列的最佳比对而需要引入的缺口的数目和每个缺口的长度的条件下,这些序列所共享的相同位置数的函数。

[0139] 序列的比较和两个序列之间百分比同一性的测定可以使用数学算法完成。在优

选的实施方法中,两个氨基酸序列之间的百分比同一性使用 Needleman 和 Wunsch((1970) J. Mol. Biol. 48 :444-453) 算法测定,该算法已经纳入 GCG 软件包(可在 <http://www.gcg.com> 获得)的 GAP 程序中,其使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵,和 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口加权和 1、2、3、4、5 或 6 的长度加权。在又一个优选的实施方法中,两个核苷酸序列之间的百分比同一性使用 GCG 软件包(可在 <http://www.gcg.com> 获得)中的 GAP 程序测定,其使用 NWSgapdna. CMP 矩阵和 40、50、60、70 或 80 的缺口加权和 1、2、3、4、5 或 6 的长度加权。特别优选的参数设定(也是未另外指明时应该使用的参数设定)是 Blossum 62 得分矩阵,且缺口罚分(gap penalty)为 12,缺口延伸罚分为 4,而移码缺口罚分为 5。

[0140] 两个氨基酸或核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用 Meyers 和 W. Miller((1989) CABIOS, 4 :11-17) 的算法测定,该算法已经纳入 ALIGN 程序(2.0 版),其使用 PAM120 重残表,缺口长度罚分为 12 且缺口罚分为 4。

[0141] 本文描述的核酸和蛋白质序列可以用作“查询序列”针对公共数据库进行检索,例如,以鉴定其他家族成员或相关序列。这类检索可以使用 Altschul, 等(1990) J. Mol. Biol. 215 :403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序(2.0 版)来进行。BLAST 核苷酸检索可以用 NBLAST 程序,得分 = 100, 字长 = 12 来进行以获得与本发明的核酸(SEQ ID NO :1) 分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白质检索可以用 XBLAST 程序,得分 = 50, 字长 = 3 来进行以获得与本发明的蛋白质(SEQ ID NO :1) 蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的含缺口的比对,可以利用如 Altschul 等,(1997) Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402 中所述的缺口 BLAST(Gapped BLAST)。当利用 BLAST 和缺口 BLAST 程序时,可以使用各程序的缺省参数(例如, XBLAST 和 NBLAST)。

[0142] “保守氨基酸取代”是其中将氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基替代的取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族是本领域中已经定义的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸),具有非荷电极性侧链的氨基酸(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),具有非极性侧链的氨基酸(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、色氨酸),具有 β -分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0143] 下文进一步详细描述本发明的多个方面。

[0144] 单域抗原结合性(SDAB)分子

[0145] 单域抗原结合性(SDAB)分子包括其互补决定区是单域多肽的一部分的分子。实例包括但不限于重链可变域,天然不含轻链的结合性分子,衍生自常规 4 链抗体的单一结构域,工程化改造的结构域和除了衍生自抗体的那些之外的单一结构域支架。SDAB 分子可以是任何现有的或任何将有的单域分子。SDAB 分子可以衍生自任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、美洲驼、鱼、鲨鱼、山羊、兔和牛。该术语还包括来自除了骆驼科(Camelidae)和鲨鱼之外的物种的天然存在的单域抗体分子。

[0146] 在本发明的一个方面,SDAB 分子可以衍生自在鱼中发现的免疫球蛋白的可变区,比如,例如,其衍生自鲨鱼血清中发现的称作新抗原受体(NAR)的免疫球蛋白同种型。产生衍生自 NAR(“IgNARs”)可变区的单域分子的方法在 WO 03/014161 和 Streltsov(2005) Protein Sci. 14 :2901-2909 中描述。

[0147] 根据本发明的另一方面,SDAB 分子是已知为无轻链的重链的天然存在的单域抗原结合性分子。这类单域分子公开于例如 WO 9404678 和 Hamers-Casterman, C. 等 (1993) Nature 363 :446-448。为了清楚,将这种衍生自天然不含轻链的重链分子的可变域在本文称作 VHH 或纳米抗体以将其与四链免疫球蛋白的常规 VH 相区别。这种 VHH 分子可以源自骆驼科物种,例如骆驼、美洲驼、单峰驼、羊驼和原驼。除骆驼科之外的其他物种可以产生天然不含轻链的重链分子;这些 VHH 在本发明的范围内。

[0148] 所述 SDAB 分子可以是重组的、CDR 移植的、人源化的、骆驼源化的、去免疫化的和/或体外生成的(例如,通过噬菌体展示选择的),如在下文更详细描述。

[0149] 术语“抗原结合性”旨在包括多肽的部分,例如,本文所述的单域分子,其包含形成与靶抗原或其表位结合的界面的决定子。就蛋白质(或蛋白质模拟物)而言,抗原结合部位通常包括一个或多个(至少四个氨基酸或氨基酸模拟物的)环,其形成与靶抗原结合的界面。通常,多肽的抗原结合部位,例如,单域抗体分子,包括至少一个或两个 CDR,或更通常包括至少三个、四个、五个或六个 CDR。

[0150] 术语“免疫球蛋白可变域”在本领域经常被理解为与人或动物来源的 VL 或 VH 结构域相同或基本上相同。应该认识到免疫球蛋白可变域可能在一些物种(例如,鲨鱼和美洲驼)中经过演化而在氨基酸序列上有别于人或哺乳动物的 VL 或 VH。然而,这些结构域主要涉及抗原结合。术语“免疫球蛋白可变域”通常包括至少一个或两个 CDR,或更通常包括至少三个 CDR。

[0151] “免疫球蛋白恒定域”或“恒定区”旨在包括与人或动物来源的 CL、CH1、CH2、CH3 或 CH4 结构域相同或基本上类似的免疫球蛋白结构域。参见例如 Charles A Hasemann and J. Donald Capra, Immunoglobulins :Structure and Function, in William E. Paul, ed., Fundamental Immunology, Second Edition, 209, 210-218 (1989)。术语“Fc 区”是指包括免疫球蛋白结构域 CH2 和 CH3 或与这些基本上相似的免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白恒定域的 Fc 部分。

[0152] 在一些实施方案中,所述 SDAB 分子是单价或多重特异性分子(例如,二价、三价或四价分子)。在其他实施方案中,所述 SDAB 分子是单一特异性、双重特异性、三重特异性或四重特异性分子。分子是否为“单一特异性”或“多重特异性”,例如“双重特异性”,是指结合性多肽与之反应的不同表位的数目。多重特异性分子可以对本文描述的目标多肽的不同表位为特异性的,或者可以对目标多肽以及对异源表位(如异源多肽或固体支持材料)是特异性的。

[0153] 如用于本文,术语“价”指 SDAB 分子中存在的潜在结合域,例如,抗原结合域的数目。每个结合域特异性结合一个表位。当 SDAB 分子包含多于一个结合域时,每个结合域可以特异性结合相同表位,对于具有两个结合域的抗体,称为“二价单一特异的”,或可特异性结合不同表位,对于具有两个结合域的 SDAB 分子,称为“二价双重特异的”。SDAB 分子也可以是双重特异并且对于每种特异性是二价的(称为“双重特异性四价分子”)。双重特异性二价分子,和制备它们的方法描述于例如美国专利 5,731,168 ;5,807,706 ;5,821,333 号和美国专利申请公开号 2003/020734 和 2002/0155537 中,将它们的全部内容通过提述并入本文。双重特异性四价分子,和制备它们的方法描述于例如 WO 02/096948 和 WO 00/44788 中,将这两篇的内容通过提述并入本文。一般性地参见 PCT 公开 WO 93/17715 ;WO 92/08802 ;

WO 91/00360 ;WO 92/05793 ;Tutt 等, J. Immunol. 147 :60-69(1991) ;美国专利 4, 474, 893 ; 4, 714, 681 ;4, 925, 648 ;5, 573, 920 ;5, 601, 819 号 ;Kostelny 等, J. Immunol. 148 : 1547-1553(1992)。

[0154] 在一些实施方案中,SDAB 分子是包含一个或多个单域分子(例如,纳米抗体)的单链融合多肽,其不含与一个或多个靶抗原结合的互补可变域或免疫球蛋白恒定区(例如, Fc 区)。由所述抗原结合性多肽识别的示例性靶抗原包括肿瘤坏死因子 α (TNF α)。在一些实施方案中,所述抗原结合性单域分子与血清蛋白结合,所述血清蛋白例如,选自血清白蛋白(人血清白蛋白(HSA))或转铁蛋白中的一种或多种的人血清蛋白。

[0155] TNF α

[0156] 本领域已知肿瘤坏死因子 α 与炎症病症如类风湿性关节炎、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎和多发性硬化有关。TNF α 和受体(CD120a 和 CD120b)均得到了大量详细的研究。处于其生物活性形式的 TNF α 是三聚体。已经开发了几种使用抗 TNF α 抗体拮抗 TNF α 作用的策略且目前在商业上是可以获得的,如 Remicade® 和 Humira®。针对 TNF α 的抗体分子是已知的。TNF α 结合性单域抗原结合性分子(例如,纳米抗体)的多个实例公开于 WO 2004/041862, WO 2004/041865, WO 2006/122786, 将它们的全部内容以其整体通过提述并入本文。单域抗原结合性分子的其他实例公开于 US 2006/286066, US 2008/0260757, WO 06/003388, US 05/0271663, US 06/0106203, 将它们的全部内容以其整体通过提述并入本文。在其他实施方案中,针对 TNF α 和血清蛋白(例如 HSA)的单一、双重、三重和其他多重特异性单域抗体公开于这些参考文献中。

[0157] 在具体的实施方案中,所述 TNF α 结合性纳米抗体分子包括 WO 2006/122786 中公开的纳米抗体中的一种或多种。例如,所述 TNF α 结合性纳米抗体分子可以是 WO 2006/122786 中公开的单价、二价、三价 TNF α 结合性纳米抗体分子。示例性 TNF α 结合性纳米抗体包括但不限于 TNF1、TNF2、TNF3、其人源化形式(例如, TNF29、TNF30、TNF31、TNF32、TNF33)。单价 TNF α 结合性纳米抗体的其他实例公开于 WO 2006/122786 的表 8。示例性二价 TNF α 结合性纳米抗体分子包括但不限于 TNF55 和 TNF56, 其包含两个通过肽接头连接的 TNF30 纳米抗体以形成单一融合多肽(公开于 WO 2006/122786)。二价 TNF α 结合性纳米抗体分子的其他实例作为 TNF4、TNF5、TNF6、TNF7、TNF8 公开于 WO 2006/122786 的表 19。

[0158] 在其他实施方案中,所述 HSA 结合性纳米抗体分子包括 WO2006/122786 中公开的纳米抗体中的一种或多种。例如,所述 HSA 结合性纳米抗体分子可以是 WO 2006/122786 中公开的单价、二价、三价 HSA 结合性纳米抗体分子。在其他实施方案中,所述 HSA 结合性纳米抗体分子可以是具有至少一种与 HSA 结合的结合特异性的单一特异性或多重特异性分子。示例性 TNF α 结合性纳米抗体包括但不限于 WO 06/122786 中公开的 ALB1、其人源化形式(例如, ALB6、ALB7、ALB8、ALB9、ALB10)。

[0159] 在其他实施方案中,将纳米抗体分子的单域分子中的两个或更多个用或不用连接基团融合,作为基因或多肽融合物。所述连接基团可以是任何对于本领域技术人员显而易见的连接基团。例如,所述连接基团可以是长度为 1 至 100 个原子的生物相容性聚合物。在一个实施方案中,所述连接基团包括或其组成为聚甘氨酸、聚丝氨酸、聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚异亮氨酸或聚精氨酸残基,或其组合。例如,所述聚甘氨酸或聚丝氨酸接头可以包括至少五个、七个、八个、九个、十个、十二个、十五个、二十个、三十个、三十五个和四十个甘氨酸和

丝氨酸残基。能够使用的示例性接头包括 Gly-Ser 重复序列,例如,以一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个重复的 (Gly)₄-Ser (SEQ ID NO :8) 重复序列。在多个实施方案中,所述连接基具有以下序列:(Gly)₄-Ser-(Gly)₃-Ser (SEQ ID NO :9) 或 ((Gly)₄-Ser)_n (SEQ ID NO :10),其中 n 是 4、5 或 6。

[0160] 在一个示例性实施方案中,在本文中称作“ATN-103”的由两个与靶抗原(例如,肿瘤坏死因子 α (TNF α)) 结合的单域抗体分子(例如,两个骆驼科动物可变区)和一个与血清蛋白(例如,HSA)结合的单域抗体分子(例如,一个骆驼科动物可变区)的单链多肽融合物构成的抗原结合性多肽已经显示与蛋白 A 或其功能性变体结合。ATN-103 是人源化的、三价、双重特异性、TNF α 抑制性融合蛋白。这种蛋白质的抗原是肿瘤坏死因子 α (TNF)。图 29 提供了 ATN-103 的预测结构的示意图。这种融合蛋白源自骆驼科动物并且与人免疫球蛋白 VH 域具有高度序列和结构同源性。其单一多肽链由两个对 TNF α 的结合域和一个对人血清白蛋白 (HSA) 的结合域构成,带有连接所述结构域的两个九氨基酸 G-S 接头。ATN-103 的详述提供在 WO 06/122786 中。

[0161] 从相应表达载体的 DNA 序列预测的 ATN-103 多肽链的完整氨基酸序列示于图 30 中(残基的编号以 NH₂ 端起始作为 SEQ ID NO :1 的 1 号残基)。由所述 DNA 序列编码的最后一个氨基酸残基为 S³⁶³ 并且构成所述蛋白质的 COOH 端。二硫键键合的 ATN-103 (没有翻译后修饰) 的预测分子量为 38434.7Da。ATN-103 不含 N 联糖基化共有序列。通过纳电喷雾电离四极杆飞行时间质谱 (nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry) 观察到的主要亚型的分子量相当于 38433.9Da,确认了不存在翻译后修饰。

[0162] 在图 30 中,互补决定区 (CDR) 标有下划线。预测的分子内二硫键由涉及的半胱氨酸残基的连接来说明。TNF 的结合域以粗体显示且与 HSA 的结合域以粗斜体显示。连接这些结合域的氨基酸接头为斜体。还显示了所述多肽链的信号肽 (¹⁹MGW...VHS⁻¹)。

[0163] SDAB 分子的制备

[0164] 所述 SDAB 分子可以包含一个或多个重组的、CDR 移植的、人源化的、骆驼源化的、去免疫化的和/或体外生成的(例如,通过噬菌体展示选择的)单域分子(例如,纳米抗体分子)。用于生成抗体和 SDAB 分子以及重组修饰它们的技术是本领域已知的并且在下文详细描述。

[0165] 本领域技术人员已知的多种方法可用于获得抗体。例如,单克隆抗体可以通过按照已知方法生成杂交瘤来产生。然后使用标准方法,如酶联免疫吸附测定 (ELIS) 和表面等离子共振 (BIACORE™) 分析来筛选以这种方式形成的杂交瘤,以鉴定一种或多种产生与指定抗原特异性结合的纳米抗体的杂交瘤。可以使用指定抗原的任何形式用作免疫原,例如,重组抗原,天然存在的形式,它们的任何变体或片段,以及它们的抗原性肽。

[0166] 制备抗体和 SDAB 分子的一个示例性方法包括筛选蛋白表达文库,例如,噬菌体或核糖体展示文库。噬菌体展示记载在例如 Ladner 等,美国专利 5,223,409 号;Smith (1985) Science 228:1315-1317;WO 92/18619;WO 91/17271;WO 92/20791;WO 92/15679;WO 93/01288;WO 92/01047;WO 92/09690;和 WO 90/02809 中。

[0167] 除了使用展示文库,还可以使用指定抗原来免疫非人动物,例如,啮齿动物,例如,小鼠、仓鼠或大鼠。在一个实施方案中,所述非人动物包括人的至少部分免疫球蛋白基因。

例如,可以用人 Ig 基因座的大片段工程化改造在小鼠抗体产生上缺陷的小鼠株。使用杂交瘤技术,可以产生和选择衍生自具有期望特异性的基因的抗原特异性单克隆抗体。参见,例如, XENOMOUSE™, Green 等 (1994) Nature Genetics 7 :13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, 于 1996 年 10 月 31 日公开,和 PCT 申请号 PCT/US96/05928, 于 1996 年 4 月 29 日提交。

[0168] 在另一实施方案中,从非人动物获得 SDAB 分子,然后修饰,例如,人源化、去免疫化、嵌合,可以使用本领域已知的重组 DNA 技术来产生。已经描述过多种用于制备嵌合抗体和 SDAB 分子的方法。参见,例如, Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81 :6851, 1985 ; Takeda 等, Nature 314 :452, 1985, Cabilly 等, 美国专利 4, 816, 567 号 ; Boss 等, 美国专利 4, 816, 397 号 ; Tanaguchi 等, 欧洲专利公开 EP171496 ; 欧洲专利公开 0173494, 英国专利 GB 2177096B。也可以使用,例如,表达人重链和轻链基因,但无法表达内源小鼠免疫球蛋白重链和轻链基因的转基因小鼠来产生人源化抗体和 SDAB 分子。Winter 描述了一种示例性 CDR 移植方法,其可以用于制备本文描述的人源化抗体和 SDAB 分子(美国专利 5, 225, 539 号)。特定人抗体的所有 CDR 可以用非人 CDR 的至少一部分替代,或者仅仅所述 CDR 中的一些可以用非人 CDR 替代。只是有必要替代人源化抗体和 SDAB 分子结合到预定抗原所需的 CDR 数。

[0169] 人源化抗体可以通过将不直接参与抗原结合的 Fv 可变域的序列用来自人 Fv 可变域的等价序列替代来生成。用于生成人源化抗体或其片段的示例性方法由 Morrison (1985) Science 229 :1202-1207 ; 由 Oi 等 (1986) BioTechniques 4 :214 ; 以及由 US 5, 585, 089 ; US 5, 693, 761 ; US 5, 693, 762 ; US 5, 859, 205 ; 和 US 6, 407, 213 提供。这些方法包括分离、操作和表达编码来自至少重链或轻链之一的免疫球蛋白 Fv 可变域的全部或部分的核酸序列。这些核酸可以从针对预定的靶产生纳米抗体的杂交瘤获得,如上所述,以及从其他来源获得。然后将编码人源化 SDAB 分子,例如,纳米抗体分子的重组 DNA 克隆至合适的表达载体中。

[0170] 在一些实施方案中,将人源化 SDAB 分子,例如,纳米抗体分子通过引入保守取代、共有序列取代、种系取代和 / 或回复突变来优化。这些改变的免疫球蛋白分子可以通过本领域已知的数种方法中的任一制备(例如, Teng 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 80 : 7308-7312, 1983 ; Kozbor 等, Immunology Today, 4 :7279, 1983 ; Olsson 等, Meth. Enzymol. , 92 :3-16, 1982), 并且可以根据 PCT 公开 W092/06193 或 EP 0239400 的教导制备。

[0171] 用于人源化 SDAB 分子,例如,纳米抗体分子的技术公开在 WO 06/122786 中。

[0172] SDAB 分子,例如,纳米抗体分子,也可以通过特异性缺失人 T 细胞表位或通过公开在 WO 98/52976 和 WO 00/34317 中的方法“去免疫化”来修饰。简言之,可以分析重链和轻链可变域(例如,纳米抗体的)结合 II 类 MHC 的肽;这些肽代表潜在的 T 细胞表位(如 WO 98/52976 和 WO 00/34317 中定义的)。对于潜在 T 细胞表位的检测,可以采用称为“肽穿针引线(peptide threading)”的计算机建模方法,此外可以对人 II 类 MHC 结合性肽的数据库检索存在于 V_H 和 V_L 序列中的基序,如 WO 98/52976 和 WO 00/34317 中所述。这些基序结合至 18 种主要 II 类 MHC DR 同种异型,并由此构成潜在 T 细胞表位。检测出的潜在 T 细胞表位可以通过取代可变域中的少量氨基酸残基,或优选通过单氨基酸取代来去除。通常,进行保守取代。通常,但不排除其他情况,可以使用对于人种系抗体序列中的位置而言

常见的氨基酸。人种系序列,例如,公开在 Tomlinson 等 (1992) *J. Mol. Biol.* 227 :776-798 ; Cook, G. P. 等 (1995) *Immunol. Today* Vol. 16 (5) :237-242 ;Chothia, D. 等 (1992) *J. Mol. Biol.* 227 :799-817 ;和 Tomlinson 等 (1995) *EMBO J.* 14 :4628-4638 中。V BASE 名录提供了人免疫球蛋白可变区序列的综合名录 (由 Tomlinson, I. A. 等 MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK 编纂)。这些序列可以用作人序列的来源,例如,对于框架区和 CDR。也可以使用人的共有框架区,例如,如 U. S. 6, 300, 064 中所述。

[0173] SDAB 分子,例如,纳米抗体分子,可以由经过遗传工程化改造而产生所述蛋白质的活宿主细胞产生。遗传工程改造细胞以产生蛋白质的方法是本领域公知的。参见例如 Ausabel 等, eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York)。这些方法包括将编码所述蛋白质并允许所述蛋白质表达的核酸引入活宿主细胞。这些宿主细胞可以是在培养中生长的细菌细胞、真菌细胞或优选是动物细胞。细菌宿主细胞包括但不限于大肠杆菌细胞。合适的大肠杆菌菌株的实例包括: HB101、DH5a、GM2929、JM109、KW251、NM538、NM539, 和任何无法切割外源 DNA 的大肠杆菌菌株。能使用的真菌宿主细胞包括但不限于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 细胞。能使用的几个动物细胞系的实例是 CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3 和 WI38。可以使用本领域技术人员公知的方法建立新的动物细胞系 (例如,通过转化、病毒感染和 / 或选择)。任选地,所述蛋白质可以由所述宿主细胞分泌至培养基中。

[0174] 修饰的 SDAB 分子

[0175] 本发明的制剂可以含有至少一中 SDAB 分子,例如,纳米抗体分子,其具有与天然存在的结构域,例如, VH 域在一个框架区内的至少一个氨基酸位置处不同的氨基酸序列。

[0176] 应该理解本发明的一些 SDAB 分子 (例如人源化 SDAB 分子) 的氨基酸序列可以与天然存在的结构域,例如,天然存在的 VHI-I 域的氨基酸序列在至少一个框架区中的至少一个氨基酸位置处不同。

[0177] 本发明还包括所述 SDAB 分子的衍生物的制剂。这些衍生物通常可以通过修饰,并且具体而言通过化学和 / 或生物 (例如酶的) 修饰 SDAB 分子和 / 或形成本文公开的 SDAB 分子的一个或多个氨基酸残基来获得。

[0178] 这些修饰的实例,以及能够以这样的方式修饰的 SDAB 分子序列内的氨基酸残基的实例 (即,或者在蛋白质骨架上,但优选在侧链上),能够用于引入这样的修饰的方法和技术,以及这些修饰的潜在用途和优势对于技术人员会是显而易见的。

[0179] 例如,这样的修饰可以涉及向所述 SDAB 分子中或所述 SDAB 上引入 (例如通过共价连接或以其他合适的方式) 一个或多个官能团、残基或部分 (moiety),并且具体而言一个或多个赋予所述 SDAB 分子一种或多种期望的性质或功能的官能团、残基或部分。这些官能团的实例对于技术人员会是显而易见的。

[0180] 例如,这种修饰可以包含引入 (例如通过共价结合或以任何其他合适的方式) 一个或多个官能团,所述官能团增加所述 SDAB 分子的半衰期、溶解度和 / 或吸收,降低所述 SDAB 分子的免疫原性和 / 或毒性,去除或削弱所述 SDAB 分子的任何不合期望的副作用,和 / 或赋予所述 SDAB 分子其他有利的性质和 / 或减少不合期望的性质;或前述的两项或更多项的任意组合。这些官能团和用于引入他们的技术的实例对于技术人员会是显而易见的,

并且通常可以包含所有本文在上引用的一般背景技术中提及的全部官能团和技术,以及本身已知的用于修饰药物蛋白,并且特别是用于修饰抗体或抗体片段(包括 ScFv's 和 148 单域抗体)的官能团和技术,对此参考例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980)。这种官能团可以例如直接连接至(例如,共价地)本发明的纳米抗体,或任选地通过合适的接头或间隔物(spacer)连接,其对于技术人员也会是显而易见的。

[0181] 一种广泛使用的增加药物蛋白的半衰期和/或降低免疫原性的技术包括附接合适的药理学可接受的聚合物,如聚乙二醇(PEG)或其衍生物(例如甲氧基聚乙二醇或 mPEG)。通常,可以使用任何合适形式的聚乙二醇化,例如本领域用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)域抗体和 ScFv's)的聚乙二醇化;参考例如 Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese 和 Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), Harris 和 Chess, Nat. Rev. Drug Discov., 2, (2003) 和 WO 04/060965。多种用于蛋白质的聚乙二醇化的试剂在商业上也是可以获得的,例如,从 Nektar Therapeutics, USA 获得。

[0182] 优选地,使用定点聚乙二醇化,特别是通过半胱氨酸残基(参见例如 Yang 等, Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003))。例如,为了这个目的,PEG 可以附接于天然存在于 SDAB 分子中的半胱氨酸残基,SDAB 分子可以经修饰从而合适地引入一个或多个用于附接 PEG 的半胱氨酸残基,或者可以将包含一个或多个用于附接 PEG 的半胱氨酸残基的氨基酸序列融合至本发明的纳米抗体的 N 端和/或 C 端,其全部使用技术人员本身已知的蛋白质工程技术。

[0183] 优选地,对于 SDAB 分子,使用的 PEG 具有大于 5000 的分子量,例如大于 10000 且小于 200000,例如小于 100000;例如在 20000-80000 的范围内。

[0184] 关于聚乙二醇化,应该注意通常情况下,本发明还涵盖任何在一个或多个氨基酸位置经聚乙二醇化的 SDAB 分子,优选以这样一种方式,即所述聚乙二醇化(1)增加体内半衰期;(2)降低免疫原性;(3)提供对于聚乙二醇化本身已知的一种或多种其他有益性质;(4)基本上不影响所述 SDAB 分子的亲和力(例如,如通过合适的测定法,如那些在下文实施例中描述的测定法测定,不使所述亲和力降低超过 90%,优选不超过 50%,和不超过 10%);和/或(4)不影响所述 SDAB 分子的任何其他期望的性质。合适的 PEG 基团和用于特异性或非特异性附接它们的方法对于技术人员会是显而易见的。

[0185] 另一种通常较不优选的修饰包括 N 联或 O 联糖基化,其通常作为与翻译同步(co-translational)和/或翻译后修饰的一部分,依赖于用于表达所述 SDAB 分子的宿主细胞。

[0186] 制剂

[0187] SDAB 分子例如纳米抗体分子的制剂包含 SDAB 分子、能够充当冷冻保护剂的化合物和缓冲剂。所述制剂的 pH 通常为 pH 5.5-7.0。在一些实施方案中,制剂作为液体储存。在其他实施方案中,将制剂制备成液体然后在储存前干燥,例如,通过冻干或喷雾干燥。干燥的制剂可以作为干燥化合物使用,例如,作为气溶胶或散剂,或复原成其原始浓度或另一浓度,例如,使用水、缓冲液或其他合适的液体。

[0188] 将所述 SDAB 分子纯化工工艺设计成允许将 SDAB 分子转移至适合于作为冷冻的液体长期储存且后续用于冷冻干燥的制剂(例如,使用组氨酸/蔗糖制剂)中。将所述制剂冻

干,其中所述蛋白质在特定浓度。然后将冻干的制剂视需要用合适的稀释剂(例如,水)复原以将原始的制剂组分重新溶解成期望的浓度,通常为与冻干之前的浓度相比相同或更高的浓度。

[0189] 可以将所述冻干制剂复原以产生浓度与原始浓度(即,冻干之前)不同的制剂,其依赖于相对于原始所冷冻干燥的液体体积而言向所述冻干物加入的水或稀释剂的量。合适的制剂可以通过测定一种或多种抗体完整性参数来鉴定。测定的参数通常为 HMW 物质的百分比或 LMW 物质的百分比。

[0190] 所述 HMW 物质或 LMW 物质的百分比或者作为占制剂中总蛋白含量的百分比测定或者作为随着时间变化的(即,在储存过程中)百分比增加变化来测定。可接受的制剂中 HMW 物质的总百分比在作为冻干物或液体在 -20°C 至 40°C (例如,在 -20°C 至 25°C ,在 -20°C 至 15°C ,在 2°C 至 8°C ,在约 2°C ,或在约 25°C) 储存至少 1 年后不超过 10% HMW 物质,或作为冻干物或液体在 -20°C 至 40°C 储存至少 1 年之后不超过约 10% LMW 物质。“约”的意思是所涉及数值的 $\pm 20\%$ 。因此“约 20°C ”是指 16°C 至 24°C 。

[0191] 通常,稳定性概貌为对于冷藏产品在 2° -8°C 而对于室温产品在 25°C 低于 10% HMW/LMW。于复原所述冻干物之后在作为冻干物储存的制剂中测定 HMW 物质或 LMW 物质。 40°C 为一种加速条件 (accelerated condition),其通常用于在短期暴露于非储存条件的情况下测试稳定性和确定稳定性,例如,像可能存在于运输过程中的产品转移过程中的。

[0192] 当测定的参数是 HMW 物质或 LMW 物质的百分比变化时,将储存之后在一种或两种物质中总蛋白质的百分比与储存之前(例如,在制备所述制剂时)一种或两种物质中总蛋白质百分比相比。确定百分比的差异。通常,在 2° -8°C 或 25°C 储存 18 至 24 个月之后液体制剂中 HMW 物质或 LMW 物质中蛋白质百分比的变化不超过 10%,例如,不超过约 8%,不超过约 7%,不超过约 6%,不超过约 5%,不超过约 4%,或不超过约 3%。“约”是指所涉及数值的 $\pm 20\%$,通常,在 10% 之内,并且更通常,在给定数值或数值范围的 5% 之内。如此,约 10% 是指 8% 至 12%。作为冻干产品储存的制剂在复原之后,或在于 -30°C -8°C (例如, 4°C 或 -20°C) 储存约 6、9、10、12、15、18 至 24 个月之后的液体制剂中,通常具有少于约 5%,少于约 4%,少于约 3%,少于约 2%,或少于约 1% 的 HMW 物质或少于约 5%,少于约 4%,少于约 3%,少于约 2%,或少于约 1% 的 LMW 物质。

[0193] SDAB 分子(例如, TNF 结合性纳米抗体分子)的制剂可以作为冷冻液体制剂或冻干物储存例如至少 6、9、10、12 个约,或至少两年,至少三年,至少四年,或至少五年。在一个实例中, TNF 结合性纳米抗体分子制剂含有 10mM 组氨酸、5% 蔗糖、0.01% 聚山梨酯 80、50mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在另一实例中,所述 TNF 结合性纳米抗体分子制剂含有 20mM 组氨酸、7.5% 蔗糖、0.01% 聚山梨酯 80、50mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 20mM 组氨酸、10% 蔗糖、0.02% 聚山梨酯 80、100mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5% 蔗糖、50mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 20mM 组氨酸、10% 蔗糖、100mg/mL TNF 结合性纳米抗体且具有 6.0 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5% 蔗糖、0.01% 聚山梨酯 80,约 80mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5% 蔗糖、0.01% 聚山梨酯 80、100mM 精氨酸(碱)、88 至 100mg/mL TNF 结合性纳米抗体分

子且具有 5.8 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、55mM NaCl、88 至 100mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.1 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、55mM 盐酸精氨酸、88 至 100mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.1 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、100mM 甘氨酸、88 至 100mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、100mM 甲硫氨酸、88 至 100mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、8%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、88 至 100mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、88 至 100mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 20mM 组氨酸、5%蔗糖、118mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 20mM Tris、5%蔗糖、117mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 7.2 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、约 80mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、约 50mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在一个实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 5.5 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、150mM 盐酸精氨酸、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 5.5 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、75mM 氯化钠、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 5.5 的 pH。在一个实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、150mM 盐酸精氨酸、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体且具有 6.0 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、75mM 氯化钠、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。在一个实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.5 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、150mM 盐酸精氨酸、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.5 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、75mM 氯化钠、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.5 的 pH。在一个实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 7.0 的 pH。在另一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、150mM 盐酸精氨酸、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 7.0 的 pH。在又一实例中,所述制剂含有 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、75mM 氯化钠、约 1mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 7.0 的 pH。在又一实例中,所述 TNF 结合性纳米抗体分子制剂含有 20mM 组氨酸、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、250mg/mL TNF 结合性纳米抗体分子且具有 6.0 的 pH。

[0194] 制剂的组分和测定制剂中 SDAB 分子(例如,所述 TNF 结合性纳米抗体分子)完整性的方法的其他细节在下文中提供。

[0195] 制剂中 SDAB 分子浓度通常在约 0.1mg/mL 和约 350mg/mL 之间,例如,0.5mg/mL 至约 350mg/mL,约 0.5mg/mL 至约 300mg/mL,约 0.5mg/mL 至约 250mg/mL,约 0.5mg/mL 至约

150mg/mL, 约 1mg/ml 至约 130mg/mL, 约 10mg/ml 至约 130mg/mL, 约 50mg/ml 至约 120mg/mL, 约 80mg/ml 至约 120mg/mL, 约 88mg/ml 至约 100mg/mL 或约 10mg/ml, 约 25mg/ml, 约 50mg/ml, 约 80mg/ml, 约 100mg/mL, 约 130mg/ml, 约 150mg/ml, 约 200mg/ml, 约 250mg/ml 或约 300mg/ml。在范围的情况下,“约”是指所述范围涉及的数值下限的-20%和涉及的数值上限的+20%。在范围的情况下,例如,约 10mg/mL 至约 100mg/mL, 这是指,在 8mg/mL 至 120mg/mL 之间。在一些情况下,制剂中 SDAB 分子浓度可以为,例如,0.1mg/mL 和 200mg/mL 之间,例如,0.5mg/mL 和 100mg/mL 之间,0.5mg/mL 和 1.0mg/mL 之间,0.5mg/mL 和 45mg/mL 之间,1mg/mL 和 10mg/mL 之间,10mg/mL 和 40mg/mL 之间,10mg/mL 和 50mg/mL 之间,50mg/mL 和 100mg/mL 之间,100mg/mL 和 200mg/mL 之间。这些 SDAB 分子制剂可以用作治疗剂。因此,制剂中 SDAB 分子的浓度足以在制剂体积中提供由要治疗的受试者所耐受的且适合于给药方法的剂量。在一个非限定性实例中,为了皮下提供高剂量(其中体积的限度很小(例如,每次注射约 1ml 至 1.2ml)),SDAB 分子的浓度通常为至少 100mg/mL 或更高,例如,100mg/mL 至 500mg/mL,100mg/mL 至 250mg/mL,或 100mg/mL 至 150mg/mL。这种高浓度可以通过例如在合适体积的稀释剂(例如,注射用无菌水、缓冲盐水)中复原冻干制剂来实现。在一些情况下,复原制剂具有约 100mg/mL 至 300mg/mL(例如,100mg/mL、125mg/mL、150mg/mL、175mg/mL、200mg/mL、250mg/mL、275mg/mL、300mg/mL)的浓度。高浓度,例如高达 250mg/mL,可以用于长期储存,例如,冷冻储存 SDAB 分子的大制备物。

[0196] 对于通过吸入的递送,所述制剂通常在某种程度上是浓缩的(例如,在约 100mg/mL 和 500mg/mL 之间)从而在吸入的气溶胶(aerosol for inspiration)的有限体积中提供充足剂量。在一些情况下,使用低浓度(例如,在约 0.05mg/mL 和 1mg/mL 之间)。本领域已知使递送的剂量适合于递送方法的方法,例如,喷射雾化器或计量气溶胶。

[0197] 缓冲剂和冻干保护剂

[0198] 如本文所述的制剂的 pH 通常在约 pH 5.0 至约 7.0 之间,例如,约 pH 5.5 至约 6.5,约 pH 5.5 至约 6.0,约 pH 6.0 至约 6.5、pH 5.5、pH 6.0 或 pH 6.5。通常,使用能够将溶液保持在 pH 5.5 至 6.5 的缓冲剂来制备制剂,例如,具有约 6.0 的 pKA 的缓冲剂。合适的缓冲剂包括但不限于组氨酸缓冲剂、TRIS、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、二甲基胍酸盐、磷酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐和柠檬酸盐。缓冲剂的浓度在约 4mM 和约 60mM 之间,例如,约 5mM 至约 25mM,例如,组氨酸通常以至多 60mM 的浓度使用。在一些情况下,组氨酸缓冲剂以约 5mM、约 10mM 或约 20mM 的浓度使用。在其他情况下,乙酸盐或琥珀酸盐缓冲剂以约 5mM 或约 10mM 的浓度使用。

[0199] 冷冻保护剂是本领域已知的并且包括例如蔗糖、海藻糖和甘油。通常使用在生物系统中展现低毒性的冷冻保护剂。冷冻保护剂以约 0.5%至 15%,约 0.5%至 2%,约 2%至 5%,约 5%至 10%,约 10%至 15%,和约 5%(重量/体积)的浓度包括在制剂中。

[0200] 能够作为缓冲剂在 TNF 结合性纳米抗体制剂中使用的组氨酸缓冲剂可以具有冷冻保护剂性质。在本发明的一些实施方案中,将组氨酸缓冲剂与冷冻保护剂如糖,例如,蔗糖联合使用。本发明的制剂可以具体排除以任何实质性的量使用组氨酸,例如,组氨酸既不是所述制剂的缓冲剂也不是冷冻保护剂组分。

[0201] 制剂的粘度通常为与所述制剂的给药途径相容的粘度。在一些实施方案中,所述制剂的粘度在 1cP 和 4cP 之间,约 2cP 至 3.5cP。在其他实施方案中,所述制剂的粘度在约

5cP 和约 40cP 之间。在具体的实施方案中,所述制剂的粘度为约 1cP、2cP、2.4cP 至 2.8cP、3cP、3.1cP 至 3.2cP、4cP、5cP、10cP、15cP、20cP、25cP、30cP、35cP 或 40cP。

[0202] 表面活性剂

[0203] 在一些实施方案中,在所述制剂中包括表面活性剂。表面活性剂的实例包括但不限于非离子表面活性剂如聚山梨酯(例如,聚山梨酯-20,聚山梨酯-40,聚山梨酯-60,聚山梨酯-65,聚山梨酯-80 或聚山梨酯-85);Triton™;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基葡糖苷钠(sodium octyl glycoside);月桂基磺基甜菜碱(lauryl-sulfobetaine),肉豆蔻基磺基甜菜碱(myristyl-sulfobetaine),亚油烯基磺基甜菜碱(linoleyl-sulfobetaine),硬脂酰磺基甜菜碱(stearyl-sulfobetaine),月桂基肌氨酸(lauryl-sarcosine),肉豆蔻基-肌氨酸(myristyl-sarcosine),亚油烯基肌氨酸(linoleyl-sarcosine),硬脂酰肌氨酸(stearyl-sarcosine),亚油烯基甜菜碱(linoleyl-betaine),肉豆蔻基甜菜碱(myristyl-betaine),鲸蜡基甜菜碱(cetyl-betaine),月桂酰胺丙基甜菜碱(lauroamidopropyl-betaine),椰油酰胺丙基甜菜碱(cocamidopropyl-betaine),亚油酰胺丙基甜菜碱(linoleamidopropyl-betaine),肉豆蔻酰胺丙基甜菜碱(myristamidopropyl-betaine),棕榈酰胺丙基甜菜碱(palmidopropyl-betaine),异硬脂酰胺丙基甜菜碱(isostearamidopropyl-betaine)(例如月桂酰胺丙基(lauroamidopropyl)),肉豆蔻酰胺丙基(myristarnidopropyl-),棕榈酰胺丙基(palmidopropyl-)或异硬脂酰胺丙基(isostearamidopropyl-)二甲胺;甲基椰油酰牛磺酸钠(sodium methyl cocoyl-aurate)或甲基油酰基牛磺酸二钠(disodium methyl ofeyl-aurate);和 Monaquat™ 系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.),聚乙二醇(polyethyl glycol),聚丙二醇(polypropyl glycol)以及乙二醇和丙二醇的共聚物例如,泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆 188)。

[0204] 加入的表面活性剂的量是使复原的蛋白质的聚集减少至可接受水平(如使用例如对 HMW 物质或 LMW 物质的 SEC-HPLC 测定的)并使 TNF 结合性纳米抗体制剂的冻干物复原之后的颗粒最小化。还已经证明了表面活性剂的加入使 TNF 结合性抗体的冻干制剂的复原时间减少,并有助于所述溶液的脱气。例如,所述表面活性剂可以以约 0.001% 至 0.6%,例如,从约 0.005% 至 0.05%,约 0.005% 至约 0.2%,和约 0.01% 至 0.2% 的量存在于所述制剂(液体或在冻干之前)中。

[0205] 向制剂的添加

[0206] 将制剂作为无菌溶液或无菌冻干物储存。防止制剂中微生物的作用也可以通过在制剂中包括至少一种抗菌剂和/或抗真菌剂来实现,例如,对羟基苯甲酸酯类,三氯叔丁醇,苯酚,抗坏血酸,硫柳汞等。在一些情况下,将冻干物用抑菌水(例如,含有 0.9% 苯甲醇的水)复原。考虑在制剂中包括防腐剂是本领域已知的,鉴定与特定制剂和递送方法相容的防腐剂的方法也是如此(例如,参见, Gupta 等(2003), AAPS Pharm. Sci. 5:article 8, p. 1-9)。

[0207] 在一些情况中,所述制剂是等张的。通常,可以向制剂加入任何对溶液摩尔渗透压浓度/张度有贡献的组分(例如,盐类、糖类、多元醇或其组合)。等张通常以等张浓度使用碱性制剂组分(如蔗糖)或通过加入额外组分如糖、多元醇如甘露醇或山梨糖醇或盐如氯化钠来实现。

[0208] 在一些情况下,在 TNF 结合性纳米抗体制剂中使用盐,例如,以实现等张或增加所述制剂的 TNF 结合性纳米抗体的完整性。适合使用的盐在上文中讨论。盐浓度可以为 0mM 至约 300mM。

[0209] 在一些情况中,所述制剂用 Tween (例如, Tween® 20, Tween® 80) 制备以减少界面降解。Tween 浓度可以从约 0.001% 至约 0.05%。在一个实例中,以制剂中 0.01% 的浓度使用 Tween 80。

[0210] 在一些其他情况下,所述制剂用精氨酸制备。制剂中的精氨酸浓度可以从 0.01% 至约 5%。在一个实例中,以制剂中 2% 的浓度使用精氨酸。在一些情况下,将 Tween 和精氨酸二者加入本文描述的 TNF 结合性制剂。

[0211] 在其他情况下,所述制剂可以用如下中的至少一种制备:山梨糖醇、甘氨酸、甲硫氨酸或氯化钠。如果所述制剂中包括山梨糖醇,那么其可以约 1% 至约 10% 之间的浓度加入。在一个实例中,山梨糖醇以 5% 的浓度存在于所述制剂中。如果所述制剂中包括甘氨酸,那么其可以约 0.1% 至约 2% 之间的浓度加入。在一个实例中,甘氨酸以 1% 的浓度存在于所述制剂中。如果所述制剂中包括甲硫氨酸,那么其可以约 5mM 至约 150mM 的浓度加入。在一个实例中,甲硫氨酸以 100mM 的浓度加入至制剂中。在另一实例中,甲硫氨酸以约 10mM、约 20mM 或约 70mM 的浓度加入至制剂中。如果在所述制剂中包括氯化钠,那么其可以约 5mM 至约 100mM 之间的浓度加入。在一个实例中,氯化钠以 55mM 的浓度加入至所述制剂中。

[0212] 储存和制备方法

[0213] 冷冻

[0214] 在一些情况下,将含有抗体的制剂冷冻以供储存。因此,理想的是所述制剂在这些条件下是相对稳定的,包括在冻融循环下。一种测定制剂的适合性的方法是使样品制剂经历至少两个,例如,三个、四个、五个、八个、十个或更多个冷冻(在例如, -20°C 或 -80°C) 和融化(例如通过在 37°C 水浴中的快速融化或在 2° -8°C 的缓慢融化)循环,测定所述冻融循环之后积累的 LMW 物质和 / 或 HMW 物质的量,并将其与在所述冻融流程之前该样品中存在的 LMW 物质或 HMW 物质的量进行比较。LMW 或 HMW 物质的增加表明降低的稳定性。

[0215] 冻干

[0216] 制剂可以在冻干之后储存。因此,测试在冻干之后所述制剂蛋白质组分的稳定性可用于测定制剂的适合性。所述方法类似于在上文中描述的用于冷冻的方法,除了将样品制剂冻干而非冷冻,复原成其原始体积,并测试 LMW 物质和 / 或 HMW 物质的存在。将冻干的样品制剂与未冻干的相应的样品制剂比较。与相应的样品相比冻干样品中 LMW 或 HMW 物质的增加表明该冻干样品降低的稳定性。

[0217] 通常而言,冻干方案包括将样品加载至冻干机中,预冷期,冷冻,真空起始,逐渐上升 (ramp to) 至初次干燥温度,初次干燥,逐渐上升至第二干燥温度,二次干燥,并给样品加塞。能够选择用于冻干方案的其他参数包括真空(例如,以微米计)和冷凝器温度。温度的合适缓变率为约 0.1°C / 分至 2°C / 分,例如 0.1°C / 分至 1.0°C / 分、0.1°C / 分至 0.5°C / 分、0.2°C / 分至 0.5°C / 分、0.1°C / 分、0.2°C / 分、0.3°C / 分、0.4°C / 分、0.5°C / 分、0.6°C / 分、0.7°C / 分、0.8°C / 分、0.9°C / 分和 1.0°C / 分。冻干循环的冷冻过程中的合适搁板温度通常为约 -55°C 至 -5°C、-25°C 至 -5°C、-20°C 至 -5°C、-15°C 至 -5°C、-10°C 至

-5°C、-10°C、-11°C、-12°C、-13°C、-14°C、-15°C、-16°C、-17°C、-18°C、-19°C、-20°C、-21°C、-22°C、-23°C、-24°C或-25°C。搁板温度可以与初次干燥和二次干燥温度不同,例如,初次干燥可以在比二次干燥低的温度下进行。在非限定性实例中,初次干燥可以在0°C进行而二次干燥在25°C进行。

[0218] 在一些情况下,在冷冻过程中和真空起始之前使用退火方案。在这些情况下,必需选择退火时间并且所述温度通常在所述组合物的玻璃化转变温度以上。通常,退火时间约为2至15小时,约3至12小时,约2至10小时,约3至5小时,约3至4小时,约2小时,约3小时,约5小时,约8小时,约10小时,约12小时,或约15小时。退火的温度通常为约-35°C至约-5°C,例如约-25°C至约-8°C、约-20°C至约-10°C、约-25°C、约-20°C、约-15°C、约0°C或约-5°C。在一些情况中,退火温度通常为-35°C至0°C,例如-25°C至-8°C、-20°C至-10°C、-25°C、-20°C、-15°C、0°C。

[0219] 本文描述的制剂的稳定性可以使用多种冻干参数来测试,包括:-25°C至30°C的初次干燥搁板温度,和在0°至30°C持续2小时至9小时的二次干燥时间。

[0220] 在一个非限定性实例中,以散装(bulk)且冻干的形式配制蛋白浓度为50mg/mL的TNF结合性纳米抗体、10mM组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯80、pH 6.0的制剂。在冻干之后,将产品用约一半的填充体积(fill volume)复原从而以100mg/mL递送蛋白质。证明了所述TNF抗体在冻干之后对于产品温度中的极值是鲁棒性的。在50°C储存四周后的稳定性概貌与使用多种冷冻干燥循环制备的材料相同(例如,参见图16-20),其中一些在初次干燥过程中的产品温度上有几乎10°C的差异(例如,图13)。通常而言,冻干循环可以进行10小时至100小时,例如,20小时至80小时,30小时至60小时,40小时至60小时,45小时至50小时,50小时至65小时。

[0221] 用于储存抗体制剂的温度范围的非限定性实例为约-20°C至约50°C,例如,约-15°C至约30°C、约-15°C至约20°C、约5°C至约25°C、约5°C至约20°C、约5°C至约15°C、约2°C至约12°C、约2°C至约10°C、约2°C至约8°C、约2°C至约6°C、或约2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、10°C、15°C、25°C或30°C。虽然为所述储存温度,但是在一些情况下,样品可能在能够预期用于这些组合物的储存过程中和运输条件下短时间出现的温度改变下是稳定的。

[0222] 喷雾干燥

[0223] 在一些情况下,将制剂喷雾干燥然后储存。喷雾干燥使用本领域已知的方法进行,并且可以经过修改以使用液体或冷冻喷雾干燥(例如,使用如那些来自Niro Inc. (Madison, WI), Upperton Particle Technologies (Nottingham, England) 或Buchi (Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY), 或美国专利公开号20030072718和20030082276的方法)。

[0224] SDAB分子完整性的测定

[0225] LMW物质和HMW物质的积累是抗体稳定性的有用量度。制剂中LMW或HMW的积累是作为制剂的一部分储存的蛋白质的不稳定性的指示。可以使用带有HPLC的体积排阻色谱来测定LMW和HMW物质的存在。用于这些测量的合适系统是本领域已知的,例如,HPLC系统(Waters, Milford, MA)。可以使用本领域已知的其他系统来评估制剂中抗体的完整性,例如,SDS-PAGE(以监测HMW和LMW物质)、抗体活性的生物测定法、酶联免疫吸附测定法、

结合纯化靶蛋白（例如，TNF α ）的能力和阳离子交换-HPLC (CEX-HPLC；以检测变体和监测表面电荷)。在一个实例中，生物测定法为基于细胞的测定法，其中在不同浓度的配制的纳米抗体分子存在下检查对 TNF α 依赖性活性的抑制以表明生物活性。

[0226] 制品

[0227] 本申请还提供包括如本文所述的制剂的制品并提供使用所述制剂的说明。

[0228] 要用于向受试者给药（例如，作为药物）的制剂必需是无菌的。这使用本领域已知的方法来实现，例如，通过在配制液体或冻干和复原之前或之后通过无菌过滤膜的过滤。或者，当其不会损害结构时，可以通过高压灭菌法灭菌所述制剂的组分，然后与滤器或辐射灭菌的组分组合以产生所述制剂。

[0229] 所述药物制剂可以用透皮递送装置给药，如注射器，包括皮下注射器或多室注射器。在一个实施方案中，所述装置是带有附接或整合针头的预填式注射器。在其他实施方案中，所述装置是预充式注射器而不附接有针头。所述针头可以与所述预充式注射器一起包装。在一个实施方案中，所述装置是自我注射装置，例如，自我注射器。在另一实施方案中，所述注射装置是笔式注射器。在又一实施方案中，所述注射器是标注刻度的带针注射器 (staked needle syringe)、Luer 锁定接口注射器 (Luer lock syringe) 或 Luer 滑动接口注射器 (Luer slip syringe)。其他合适的递送装置包括支架、导管、微型针头和植入式受控释放装置。所述组合物可以用标准 IV 设备静脉内给药，包括，例如，带有或不带串联滤器的 IV 管。

[0230] 在一些实施方案中，注射器适合于与自我注射装置一起使用。例如，所述自我注射装置可以包括单瓶系统，如笔式注射装置以供溶液的递送。这些装置在商业上可以从制造商处获得，如 BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D® Pen, AutoPen®, 和 OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco- Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, Iject®, J-tip Needle-Free Injector®, DosePro®, Medi- Ject®, 例如，如由 Becton Dickensen (Franklin Lakes, N. J.), Ypsomed (Burgdorf, Switzerland, www.ypsomed.com ;Bioject, Portland, Oreg. ;National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK), Medi-Ject Corp (Minneapolis, Minn.) 和 Zogenix, Inc, Emeryville, CA 制造和开发的。得到承认的包含双瓶系统的装置包括那些用于复原药筒中的冻干药物以供递送复原溶液的笔式注射系统，如 HumatroPen®。

[0231] 制品可以包括适合盛放所述制剂的容器。合适的容器可以为，但不限于，装置、瓶、小瓶、注射器、试管、雾化器（例如，超声或振动网孔式雾化器），输液包或吸入器（例如，计量吸入器 (MDI) 或干粉吸入器 (DPI)）。所述容器可以由任何合适的材料构成，如玻璃、金属或塑料如聚碳酸酯、聚苯乙烯或聚丙烯。例如，所述容器（例如，注射器或小瓶）可以由玻璃、塑料、环烯烃共聚物或环烯烃聚合物构成。任选地，所述容器（例如，注射器或小瓶）带塞，例如，橡胶塞。用于储存当前制剂的容器的具体实施方案包括：(i) 带橡皮塞的玻璃小瓶中的溶液；(ii) 带橡胶活塞的玻璃预充式注射器中的液体；和 (iii) 带橡胶活塞的预充式聚合物注射器，例如环烯烃共聚物 (COC) 或环烯烃聚合物 (COP) 中的液体。

[0232] 通常，所述注射器的材料不从所述制剂吸附大量蛋白质并且不与所述制剂的组分反应。

[0233] 在一些实施方案中，所述容器是带塞的透明玻璃瓶，例如，West 4432/50 1319 硅

化灰塞或 West 4023 Durafleur 塞。在一些实施方案中,所述容器是注射器。在具体实施方案中,在预充式注射器中所述制剂包含 100mg/mL 的 TNF 结合性纳米抗体、20mM 组氨酸、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨酯-80, pH 6.0。在另一实施方案中,在预充式环烯烃注射器和 West 4432/50 硅化灰色橡胶活塞中所述制剂包含约 10mg/mL、约 100mg/mL 的 TNF 结合性纳米抗体、20mM 组氨酸、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨酯-80, pH 6。在其他实施方案中,在预充式玻璃注射器和 West 4432/50 硅化灰色橡胶活塞或 West 4023/50 Daikyo Flourotec/B2 涂覆型橡胶活塞中所述制剂包含约 10mg/mL、约 50mg/mL、约 100mg/mL 的 TNF 结合性纳米抗体、20mM 组氨酸、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨酯-80, pH6。

[0234] 本文描述的制品可进一步包括包装材料。所述包装材料除了关于使用或给药的信息之外提供例如管理机构要求的关于能够使用该产品的情况的信息。例如,包装材料可以提供指导患者如何注射含有本文所述的制剂的预充式注射器或如何在指定时间内(例如,在 2-24 小时或更长的时间内)在水性稀释剂中复原所述冻干制剂以形成溶液的说明。本文要求保护的制剂对于人用药物产品应用是有用的。

[0235] 在一些实施方案中,所述制剂可以作为雾化器 (nebulizer) 给药。在非限定性实例中,雾化器的实例包括喷射雾化器、超声雾化器和振动网孔式雾化器。这些类别使用不同的方法以从液体产生气溶胶。通常,能够保持这些制剂中蛋白质完整性的任何气溶胶生成装置都适合于如本文所述的制剂的递送。

[0236] 在其他实施方案中,所述药物组合物可以用医疗装置给药。例如,药物组合物可以用无针头皮下注射装置给药,如公开在美国专利 5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824 或 4,596,556 号中的装置。公知的植入物和模块的实例包括:美国专利 4,487,603 号,其公开了一种用于以受控速率分配药物的植入式微型输注泵;美国专利 4,486,194 号,其公开了一种用于将药物通过皮肤给药的治疗装置;美国专利 4,447,233 号,其公开了一种用于以精确输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利 4,447,224 号,其公开了一种用于连续药物递送的流速可变的植入式输注装置;美国专利 4,439,196 号,其公开了一种具有多腔隔室 (multi-chamber compartments) 的渗透药物递送系统;和美国专利 4,475,196 号,其公开了一种渗透药物递送系统。上所述治疗组合物还可以是生物可降解或生物不可降解的持续释放制剂的形式以供皮下或肌肉内给药。参见,例如,美国专利 3,773,919 和 4,767,628 号,以及 PCT 申请 WO 94/15587 号。连续给药也可以使用植入式或外部泵来实现。给药也可以间歇进行,例如,一日一次注射,或以低剂量连续进行,例如,持续释放制剂。可以改良注射装置以最好地适用于 SDAB 分子的给药。例如,可以将注射器硅化成对于储存和递送所述 SDAB 分子最好的程度。当然,许多其他植入物、递送系统和分子也是已知的。

[0237] 本发明还描述了用于给药第一和第二药剂的装置。所述装置可以包括,例如,一个或多个用于储存药物制备物的壳体,并且可以配置成递送单位剂量的所述第一和第二药剂。可以将所述第一和第二药剂储存在相同或分开的隔室中。例如,所述装置可以在给药之前组合所述药剂。还可以使用不同的装置来给药所述第一和第二药剂。

[0238] 给药和治疗方法

[0239] 可以单独或与第二药剂组合向受试者(例如,人受试者)给药本发明的制剂,所述第二药剂例如第二治疗或药理学活性剂,以治疗或预防(例如,减少或缓解一种或多种相

关症状) TNF α 相关病症,例如,炎性或自身免疫病症。术语“治疗”是指以统计学显著程度或以本领域技术人员可以检测的程度有效改善病状、症状或与病症相关的参数或阻止病症进展的量、方式和/或模式给予治疗。有效量、方式或模式可依赖于受试者而不同并且可以为受试者度身定做。

[0240] 能够治疗的免疫病症的非限定性实例包括但不限于自身免疫病,例如,关节炎(包括类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病关节炎、狼疮相关关节炎或强直性脊柱炎)、硬皮病、系统性红斑狼疮、舍格伦综合征、脉管炎、多发性硬化、自身免疫性甲状腺炎、皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎)、重症肌无力、炎性肠疾病(IBD)、克罗恩氏病、结肠炎、糖尿病(I型);炎性病状,例如,皮肤的(例如,银屑病);急性炎性病状(例如,内毒素血症、脓毒症和败血症,中毒性休克综合征和传染病);移植排斥和变态反应。在一个实施方案中,TNF α 相关病症是关节炎性病状,例如,选自以下中的一种或多种的病症:类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎(RA)(例如,中度至重度类风湿性关节炎)、骨关节炎、银屑病关节炎或强直性脊柱炎、多关节型幼年特发性关节炎(JIA);或银屑病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、炎性肠疾病和/或多发性硬化。

[0241] 在一些实施方案中,所述制剂包括第二治疗剂。例如,对于 TNF 纳米抗体,所述第二药剂可以是抗 TNF 抗体或其 TNF 结合性片段,其中所述第二 TNF 抗体与所述制剂的 TNF 结合性 SDAB 分子具有不同的表位特异性。能够与 TNF 结合性 SDAB 共同配制的药剂的其他非限定性实例包括,例如,细胞因子抑制剂、生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、细胞毒性剂和细胞抑制剂。在一个实施方案中,额外的药剂是用于关节炎的标准治疗,其包括但不限于非甾体抗炎剂(NSAID);皮质类固醇,包括泼尼松龙,泼尼松,可的松和曲安西龙;和疾病改善性抗风湿药物(DMARD),如甲氨蝶呤,羟氯喹(Plaquenil)和柳氮磺吡啶,来氟米特(Arava®),肿瘤坏死因子抑制剂,包括伊纳西普(Enbrel®),英夫利昔单抗(Remicade®)(含或不含甲氨蝶呤),和阿达木单抗(Humira®),抗 CD20 抗体(例如,Rituxan®),可溶性白介素 1 受体,如阿那白滞素(Kineret®),金,米诺环素(Minocin®),青霉胺,和细胞毒性剂,包括硫唑嘌呤,环磷酰胺,和环孢霉素。有利地,这些组合治疗可以有利地使用较低剂量的所给药的的治疗剂,由此避免与多种单一治疗相关的可能的毒性或并发症。

[0242] 本发明的制剂可以是液态溶液的形式(例如,可注射的和可输注的溶液)。这样的组合物可以通过胃肠外模式(例如,皮下、腹膜内或肌肉内注射)或通过吸入给药。短语“胃肠外给药”如用于本文意指除了肠内和局部给药之外的给药模式,通常通过注射,并包括皮下或肌肉内给药,以及静脉内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、表皮下、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。在一个实施方案中,本文描述的制剂是皮下给药的。

[0243] 药物制剂是在制备和储存条件是无菌且稳定的。药物组合物也可以经测试以确保其满足给药的管理和工业标准。

[0244] 药物制剂可以配制成溶液、微乳剂、分散剂、脂质体或其他适合于高蛋白质浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过将本文描述的药剂以需要量与上文所列举的成分之一或组合一起(视需要)加入合适溶剂中,然后进行过滤除菌来制备。通常,分散剂通过将本文描述的药剂加入含有基础分散介质和除上文所列那些之外的所需其他成分的无菌载体中

来制备。溶液适当的流动性可以例如通过使用涂覆剂 (coating) 如卵磷脂来保持,在分散剂的情况下通过保持所需粒径来保持,和通过使用表面活性剂来保持。注射组合物的长时间吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的作用剂来实现,例如,单硬脂酸盐和明胶。

[0245] 在一些实施方案中,表征描述制剂的参数,例如,可能出现在产品标签上的参数。这些参数包括,例如,颜色(通常为无色至稍黄,或无色至黄色),澄清度(通常为澄清至稍有乳白色光,或澄清至有乳白色光),和粘度(通常为当在室温测量时,如在在 20°C 至 30°C 测量时,约 1 至 5cP 之间)。这些参数可以通过本领域已知方法测量。例如,澄清度可以使用商业上可以获得的乳光标准品(例如,可以从 Hach Company, Loveland, CO 80539 获得)来测量。

实施例

[0246] 通过以下实施例进一步说明本发明。所述实施例仅出于说明性目的提供。不应将它们理解成以任何方式限制本发明的范围或内容。

[0247] 实施例 1:高浓度 ATN-103 冻干制剂的稳定性(6 个月期间)

[0248] 储存用于例如治疗性应用的抗体的一种方法是作为通过冻干制备的干燥粉末。因此,研究了冻干 TNF 结合性制剂的长期稳定性。

[0249] 简言之,通过无菌过滤制备了含有人源化 TNF 结合性纳米抗体(50mg/ml)、10mM 组氨酸、5%蔗糖(重量/体积)、0.01%聚山梨酯 80、pH 6.0 的制剂,并将其分配至 5ml 去热原的玻璃管型瓶中,然后冻干。将所述制剂储存在 4°C、25°C 或 40°C 一个月、三个月和六个月,然后在无菌水(USP)中复原以产生复原制剂,使得所述制剂为 100mg/ml TNF 结合性纳米抗体、20mM 组氨酸、10%蔗糖、0.02%聚山梨酯 80, pH 6.0。

[0250] 高浓度液体的稳定性通过生物活性、人血清白蛋白(HSA)结合、由 SE-HPLC 测定的 HMW 百分比和 LMW 百分比、由 SDS-SE 测定的 TNF 结合性纳米抗体的百分比和非产品杂质的百分比、以及相对保留时间的 CEX-HPLC 评估和洗脱性能与 TNF 结合性纳米抗体参照标准的可比性来评估。

[0251] 使用 WO 2006/122786 中公开的测定法测定了所述冻干 TNF 结合性纳米抗体制剂的生物活性。图 1 示例了来自这样一组生物测定的数据。将该数据表示为单位每毫克。样品在储存前约为 $5-5.5 \times 10^6$ U/mg,而在温育后约为 $4.5-5.5 \times 10^6$ U/mg。整体上,在储存六个月之后在任何所述样品中在生物活性的量上均没有实质性变化。因此,如通过生物活性测定的,所述制剂适合于至少六个月的冻干制剂的储存。

[0252] 还测定了所述冻干 TNF 结合性纳米抗体制剂的人血清白蛋白(HSA)结合活性。图 2 示例了来自这样一组结合测定的数据。所述制剂的初始结合活性约为参照样品的 100%,并且在六个月的测试期中任何样品基本上均无变化。因此,如通过 HSA 结合活性测定,所述制剂适合于至少六个月的冻干制剂的储存。

[0253] 使用 SE-HPLC 测定了 HMW 物质的百分比。冻干和复原之前所述制剂中 HMW 物质的百分比约为制剂中总蛋白质的 0.1%,并且在 4°C 和 25°C 储存的所有样品中也在约 0.1% - 0.2% (图 3)。在 40°C 储存六个月之后,所述制剂含约 0.35% HMW 物质(图 3)。因此,在 4°C 和 25°C 储存六个月的样品中不存在 HMW 物质水平的实质性增加。

[0254] 使用 SE-HPLC 测定了 LMW 物质的百分比。在 4°C、25°C 和 40°C 的温度长达六个月

的制剂中 LMW 物质的百分比在检出限以下（即 0.0%）。

[0255] 使用 SDS-CE 测定了 TNF 结合性纳米抗体的百分比。制剂中 TNF 结合性纳米抗体的初始百分比约为 100%，且在测试的六个月时间内对于任何样品没有实质性变化（图 4）。

[0256] 使用 SES-CE 测定了非产品杂质的百分比。对于在 4℃、25℃和 40℃的温度长达六个月的制剂通过 SES-CE 观察到了可忽略的非产品杂质。

[0257] 还使用 CEX-HPLC 测试了冻干 TNF 结合性纳米抗体制剂以进行鉴定。在 4℃、25℃和 40℃的温度长达六个月所述制剂的洗脱性能与参照标准相当。在 4℃、25℃和 40℃的温度长达六个月在 1.00 标准处指定的峰的相对保留时间没有变化。

[0258] 还测试了对于冻干 TNF 结合性纳米抗体制剂而言聚山梨酯-80 的加入对复原性质的作用。向冻干产品加入聚山梨酯 80 通过改善外观和冻干粉末的溶解而改进了所述产品的质量，如从下表中所能看到的。

[0259] 表 1

[0260]

	用聚山梨酯-80	不用聚山梨酯-80
复原时间	2 分 39 秒	3 分 16 秒
澄清时间	即刻	< 5 分钟
起泡	几乎无泡	稍多泡沫
气泡消散	即刻	< 3 分钟

[0261] 本文描述的数据显示在不同温度下作为储存时间的函数的降解产物的变化有限。

[0262] 实施例 2：TNF 结合性纳米抗体制剂对冻干的鲁棒性

[0263] 除了通过施用目标冻干循环冻干的制剂（实施例 1），通过向相同制剂施用两个额外的“鲁棒性”冻干循环制备了另外两批（lots）药物产品。所述两个“鲁棒性”冻干循环模拟在制造设定中可能发生的显著过程偏差。在鲁棒性研究中使用与目标（对照）冻干循环研究中相同的药物产品制剂：10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、50mg/mL TNF 结合性纳米抗体，在 pH 6.0。在复原时（使用约为冻干之前填充产品体积的一半的复原稀释剂体积），所述 ATN-103 制剂如下：20mM 组氨酸、10%蔗糖、0.02%聚山梨酯 80、100mg/mL TNF 结合性纳米抗体，在 pH 6.0。

[0264] 将模拟显著过程偏差的两个鲁棒性冻干循环称作“高含水量 (high moisture)”和“攻击性 (aggressive)”。图 5 显示了经历所述鲁棒性冻干循环的制剂显示了与目标（对照）循环的制剂相当的稳定性。将所述冻干鲁棒性制剂小瓶与对照冻干循环并排置于加速稳定性实验上，并通过 SE-HPLC 分析。

[0265] 这些数据说明 ATN-103 冻干制剂对于显著过程偏差是鲁棒性的，无产品影响。

[0266] 使用 SE-HPLC 测定了经历对照和鲁棒性冻干循环的制剂的 LMW 物质的百分比。对于全部三个循环在 t_0 和 50℃长达一个月时通过 SE-HPLC 测定的冻干 TNF 结合性纳米抗体的 LMW 物质的百分比低于检出限（即，0.0%）。

[0267] 冻干实践

[0268] 在所有运行中,用铝箔在门前进行屏蔽并使用 63mm 的搁板高度以使冻干机中的辐射最小化。在全部运行中,将一个托盘完全填满以保持冻干机上的连续加载。对于全部蛋白质小瓶将塞子高压灭菌并干燥。将用于蛋白质样品的全部小瓶用去离子水清洗并去热原。用于填充其余托盘的小瓶和塞子未经处理。

[0269] 用 TNF 结合性纳米抗体制剂接种的小瓶在生物安全橱中以 160mg/ 小瓶为目标以无菌制备。在每次运行之前用 3.2ml 新鲜制剂(先前未经冻干的材料)填充用于稳定性研究的小瓶。在冻干过程中,用与目标冻干循环相容的合适缓冲剂填充别的小瓶以保持冻干机上的连续加载。通过使用蛋白质阵列内的热电偶来监测冻干。

[0270] 调制式差示扫描量热法 (mDSC)

[0271] 使用于 mDSC 的全部样品均以调制模式以 0.5℃ 的振幅和 100 秒的周期运行。对于冻干后的粉末,将样品以 2℃ /min 加热至 150℃。全部粉末样品使用氮净化手套箱 (nitrogen-purged glove box) 制备。对于液体样品,所有温度的逐渐上升 (ramp) 以 0.5℃ /min 来进行,且使温度与冻干循环中使用的温度相匹配。最终加热的逐渐上升以 2℃ /min 进行以扩大玻璃化转变。在实验台上制备了液体样品。

[0272] 含水量分析

[0273] 使用 Karl Fischer 滴定测定了冻干样品的含水量。将冻干样品用 3ml 甲醇复原。

[0274] 进行两次重复或三次重复的 500 μ L 注射。在使用后,注射 1% 水标准品作为适用性检查。

[0275] 傅里叶变换红外光谱法 (FTIR)

[0276] FTIR 测量干粉状态的抗体的二级结构。将分散在 300mg KBr 内含有约 1mg 配好的、干燥的蛋白质的小粒压制并扫描 200 次。收集数据之后,分析涉及蔗糖安慰剂的谱减法、基线校正、平滑化、二阶导数、和面积标准化。

[0277] 稳定性

[0278] 作为储存时间和温度的函数评估了制剂中冻干抗体的稳定性。冻干 TNF 结合性纳米抗体样品在冻干之后、在 2℃ -8℃ 储存四周之后和在 50℃ 储存两周和四周之后测定。将冷藏样品储存在步入式冷藏冷库中。将高温样品储存在设定为 50℃ 的 Lab Line Imperial Incubator 中。在合适的时间点将样品从储存中取出并在测定前使其回暖或冷却至室温。

[0279] 复原和视觉外观

[0280] 在用 1.3ml 无菌注射水复原之前、过程中和之后视觉检查来自冻干后分析和储存稳定性分析二者的冻干制剂小瓶。在复原之前在灯箱中相对于黑白两色的背景检查瓶中饼的颜色、完整性、含水量、颗粒和瑕疵。在视觉检查冻干饼之后,使用去盖器 (de-crimper) 将盖和螺口密封物 (crimp seal) 从小瓶去除。去塞并将无菌注射水使用合适的移液器缓慢分配至小瓶中。稀释剂用涡旋运动方式来分配以确保饼的完全润湿。一旦完全分配了稀释剂,用标准实验室计时器启动复原时间并将小瓶重新塞住。当最后一块固体溶解时完成复原。在两只手之间滚动小瓶促进复原。在冻干饼处于复原过程中时,记录关于溶解溶液的状态如澄清度、气泡形成和泡沫形成。一旦复原完成,记录复原时间,并将小瓶留在实验台上数分钟以使所得溶液能够沉降并且复原过程中形成的大多数气泡能够消散。然后在灯箱下相对于黑白两色背景检查所述复原溶液的颜色、澄清度和颗粒。

[0281] 高效体积排阻色谱 (SEC-HPLC)

[0282] 将 2 微升 TNF 结合性纳米抗体试剂的纯样品 (neat sample) 注射到带有保护柱的 G3000swxl 柱上 (TosoHaas Part Nos. 08541 和 08543)。流动相为添加了 250mM 氯化钠的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。流速为 0.75ml/min 且运行时间为 30 分钟。在 280nm 波长监测紫外吸光度。使用 Waters Empower™ 软件将该色谱图整合以将 TNF 结合性纳米抗体主峰与高分子量和低分子量物质分开。

[0283] 用于浓度测定的紫外 - 可见吸收光谱术 (A_{280})

[0284] 将具有浓度为 100mg/ml 的抗体的制剂样品通过将 10 μ l 样品分别添加至 1990 μ l 和 3990 μ l 的 10mM 组氨酸、5% 蔗糖、pH 6.0 来稀释至约 0.5mg/mL 和 0.25mg/mL。将 200 微升的所得溶液与缓冲剂空白置于 96 孔微量平板的独立孔中。在 Spectramax® Plus 平板光度计中读取所述平板在 280nm 和 320nm 的紫外吸光度。从 280nm 吸光度减去 320nm 吸光度并除以与路径长度 (1cm) 相乘的消光系数 (1.405mL/mg-cm), 测定了各孔中溶液的蛋白质浓度。采用适当的稀释因子, 并测定平均蛋白质浓度。

[0285] 用于光散射的紫外 - 可见吸收光谱术 (A_{420})

[0286] 将 200 微升的各种待分析的 TNF 结合性纳米抗体样品等分到 96 孔微量平板上的单独孔中。缓冲剂空白充当对照。在 Spectramax Plus 平板光度计上读取所述平板在 420nm 波长的可见光吸光度。

[0287] 循环开发策略

[0288] 使用一系列后续步骤 (在下描述) 来开发冻干循环。

[0289] 临界产物温度鉴定

[0290] 用于 TNF 结合性纳米抗体的临界产品温度通过调制式差向扫描量热法 (mDSC) 来鉴定。使用这种方法来鉴定冷冻产品的玻璃化转变温度 (mDSC)。使产品在初次干燥过程中保持在此温度以下的冻干循环应该生成完整的饼结构。将最低温度合适温度假定为 -25°C , 因此在开发用于冻干如本文所述的抗体的制剂和方法时通常将这个温度包括在设计用于测试条件和制剂的步骤内。

[0291] 冻干循环实施

[0292] 基于来自上文描述的研究的结果, 进行了三种不同的冻干循环来检查在开发用于制备适合于储存的冻干制剂的合适冻干流程和其他流程中感兴趣的三个参数。检查的第一个参数是对照循环, 其重复来自在先的稳定性研究的循环。全部在先的开发性稳定性循环利用了这个循环, 所以其充当此分析的起点。

[0293] 测试的第二个参数是不进行第二次干燥步骤, 从而生成具有高残余含水量的冻干饼的影响。这种冻干循环充当 TNF 结合性纳米抗体试剂对高残余含水量的敏感性的评估, 并且可以在实施正式冻干鲁棒性研究之前对早期临床批次中的制造偏差的评估中使用。

[0294] 测试的第三个参数是攻击性循环。增加初次干燥温度使其显著高于对照循环设定点能够显著增加初次干燥过程中 TNF 结合性纳米抗体试剂产品温度。这种冻干循环充当对 TNF 结合性纳米抗体试剂在冻干过程中对产品温度的敏感性的评估, 并且可以在实施正式冻干鲁棒性研究之前对早期临床批次中的制造偏差的评估中使用。

[0295] 冻干循环的评估

[0296] 将对于 TNF 结合性纳米抗体试剂进行的所选冻干循环的评估分为两个方面: 基于冻干后进行的测试的即时比较, 和在加速条件下温育之后造成的潜在长期影响。

[0297] 临界产品温度鉴定

[0298] 所述 TNF 结合性纳米抗体制剂产品含有几乎 50% 蛋白质。如此, 预测该蛋白质主导了冷冻和冻干状态的物理性质。在冻干之前, 低温调制式差向扫描量热法 (mDSC) 搜索了所述制剂的冷冻-浓缩无定形相的玻璃化转变温度。基于来自攻击性冻干开发循环的数据, 选择了 -12°C 的产品温度作为在冻干过程中保持在其之下的临界温度。

[0299] 实施例 3: TNF 结合性纳米抗体的高浓度液体制剂的稳定性 (6 个月期间)

[0300] 在一些情况下, 期望以液体模式储存 TNF 结合性纳米抗体制剂。因此, 研究了含有相对高浓度 TNF 结合性纳米抗体的液体 TNF 结合性制剂的长期稳定性。简言之, 通过无菌过滤含有人源化 TNF 结合性纳米抗体 (约 80mg/mL)、 10mM 组氨酸、 5% 蔗糖、 0.01% 聚山梨酯 80, $\text{pH } 6.0$ 的制剂至去热原的不锈钢容器中来制备所述制剂以供储存。将所述制剂储存在 -20°C 或 4°C , 持续约 3 个月和 6 个月。通过生物活性、人血清白蛋白 (HSA) 结合、由 SE-HPLC 测定的 HMW 百分比和 LMW 百分比、由 SDS-CE 测定的 ATN-103 百分比和非产品杂质百分比、和相对保留时间的 CEX-HPLC 评估和洗脱性能与 TNF 结合性纳米抗体参照标准的可比性来评估所述高浓度液体的稳定性。

[0301] 使用生物活性测定作为用于高浓度液体 TNF 结合性纳米抗体制剂的稳定性参数。所述测定如上文在实施例 1 中所述进行。将样品储存在 -20°C 和 4°C 约 3 个月和 6 个月。将数据表示为单位每毫克 (图 6)。样品在储存前约为 $6 \times 10^6\text{U/mg}$, 而在温育之后约为 $4.5\text{--}5 \times 10^6\text{U/mg}$ 。这反映了在储存过程中样品的生物活性基本上没有变化。数值上的可变性反映出测定法固有的可变性。因为样品中生物活性的量上没有减少, 所以这些数据进一步支持了所述制剂用于储存 TNF 结合性的适当性。

[0302] 而另一稳定性参数使用高浓度液体 TNF 结合性纳米抗体制剂检查: 结合活性的参数。在这些实验中, 在 -20 和 4°C 储存 6 个月之后与对照比较测定制剂的结合活性百分比。测定法特异性监测 TNF 结合性对人血清白蛋白 (HSA) 的结合亲和力。制剂的初始结合活性约为参照样品的 100% , 并且在测试的 6 个月期间对于任何样品基本上没有变化 (图 7)。测量的结合活性高达参照的约 110% , 考虑到这种测定中通常观察到的误差, 这反映了样品的结合活性基本上没有随着时间的变化, 并且在结合结果中不存在与温度相关的趋势。

[0303] 使用 SEC-HPLC 测定了 HMW 物质的百分比。在储存之前高浓度液体制剂中的高分子量物质的百分比为制剂中总蛋白质的 $0.1\% \text{--} 0.15\%$ 之间, 并且储存长达 6 个月的在 -20°C 储存的样品中约为 0.1% , 而在 4°C 储存的样品中约为 0.2% (图 8)。由此, 在 -20°C 和 4°C 储存至少 6 个月的样品中在 HMW 物质水平上没有实质性增加。

[0304] 还测定了在所述 TNF 结合性纳米抗体液体制剂中在高浓度液体 TNF 结合性纳米抗体制剂中 LMW 物质的百分比。所述制剂中的 LMW 物质的百分比在储存长达 6 个月在 -20°C 的温度在检出限以下 (即 0.0%), 并且在 4°C 的样品中约为 0.1% (图 9)。由此, 在 -20°C 和 4°C 储存至少 6 个月的样品中在 LMW 物质水平上没有实质性增加。

[0305] 使用 SE-HPLC 测定了 LMW 物质的百分比。在 4°C 、 25°C 和 40°C 的温度储存长达 6 个月所述高浓度液体制剂中 LMW 物质的百分比在检出限以下 (即 0.0%)。

[0306] 使用 SDS-CE 测定了 TNF 结合性纳米抗体的百分比。所述高浓度液体制剂中 TNF 结合性纳米抗体的初始百分比约为 100% 并且在六个月的测试期间对于任何样品基本上没有变化 (图 10)。

[0307] 使用 SDS-CE 测定了非产品杂质的百分比。对于在 -20°C 和 4°C 的温度长达 6 个月的液体高浓度 TNF 结合性纳米抗体制剂通过 SDS-CE 观察到可忽略的非产品杂质。

[0308] 还使用 CEX-HPLC 测试了所述高浓度液体制剂以进行鉴定。采用 CEX-HPLC 进行鉴定测试。高浓度液体制剂的 TNF 结合的洗脱性能与参照标准在 -20°C 和 4°C 的温度长达 6 个月的条件下相当。指定峰的相对保留时间在 -20°C 和 4°C 的温度长达 6 个月的条件下在 1.00 标准处没有变化。

[0309] 本文描述的数据显示在不同温度下作为储存时间的函数的降解产物变化有限。

[0310] 实施例 4:液体预充式注射器中 TNF 结合性纳米抗体的高浓度液体制剂的稳定性 (12 个月期间)

[0311] 借由通过 SE-HPLC 测定的 HMW 百分比和 LMW 百分比以及通过 CEX-HPLC 测定的酸性和碱性物质百分比,以及对相对保留时间和与 TNF 结合性纳米抗体参照标准洗脱性能的可比性的评估而评估了按照以下配方填充至预充式注射器中的 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的稳定性:10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80、约 80mg/mL TNF 结合性纳米抗体,于 pH 6.0。将所述制剂储存在 4°C 达 12 个月,在 25°C 达 3 个月,并在 40°C 达 2 个月。

[0312] 在初始时间点,约有 0.7% HMW 物质。在 4°C 12 个月之后,极小地增加至约 0.8% HMW 物质。在 25°C 3 个月之后,HMW 类物质增加至约 1.8%。在 40°C 2 个月之后, HMW 物质随着时间增加至约 27% (图 11)。

[0313] 在初始时间点,约有 0.1% LMW 物质。在 4°C 12 个月之后,极小地增加至约 0.25% LMW 物质。在 25°C 3 个月之后,少许增加至约 0.5% LMW。在 40°C 2 个月之后,降解随着时间增加至约 1.4% LMW 物质 (图 12)。

[0314] 在初始时间点,约有 6% 酸性物质。在 4°C 下 12 个月之后,约为 7.5% 酸性物质。在 25°C 3 个月之后,约有 7.3% 酸性物质,且酸性物质随着时间增加。在 40°C 2 个月之后,酸性物质随着时间增加至约 8.3% (图 13)。

[0315] 在初始时间点,约有 1.7% 碱性物质。在 4°C 12 个月之后,约为 2.9% 碱性物质。在 25°C 3 个月之后,约有 2.9% 碱性物质,且碱性物质随着时间增加。在 40°C 2 个月之后,碱性物质随着时间增加至约 27% (图 14)。

[0316] 全部样品的相对保留时间和洗脱性能均与 TNF 结合性纳米抗体参照标准相当。

[0317] 所述数据显示作为储存时间的函数的降解产物在 4°C 和 25°C 变化有限,表明所述制剂适合作为预充式注射器中的液体。在 40°C 观察到了降解产物中一些注意得到的变化,40°C 对于液体是应激条件。

[0318] 实施例 5:ATN-103 高浓度液体——其他制剂的稳定性 (其他稳定化和去稳定化赋形剂的鉴定)

[0319] 为了筛选用于 TNF 结合性纳米抗体液体制剂的可能的赋形剂,检查了其他高浓度 TNF 结合性纳米抗体液体制剂的稳定性。使用不同的赋形剂进行辅助工作以提供进一步的稳定性并使所述制剂等张 (适用于人受试者中的注射)。TNF 结合性纳米抗体浓度范围在 88mg/mL 到 100mg/mL。

[0320] 检查的制剂为:

[0321] 1. 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 -80、100mM 精氨酸 (碱), pH 5.8

[0322] 2. 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 -80、55mM NaCl, pH 6.1

[0323] 3. 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯-80、55mM 盐酸精氨酸, pH 6.1

[0324] 4. 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯-80、100mM 甘氨酸, pH 6.0

[0325] 5. 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯-80、100mM 甲硫氨酸, pH 6.0

[0326] 6. 10mM 组氨酸、8%蔗糖、0.01%聚山梨酯-80, pH 6.0

[0327] CTL:10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯-80, pH 6.0

[0328] 分析初始溶液的 pH、摩尔渗透压浓度、浓度、浊度和粘度。全部制剂最终均为等张溶液并借由 A455 测量显示了可接受的澄清度和低粘度 (2.4cP 至 3.1cP), 证明了预充式注射器和自我注射器的可行性。

[0329] 表 2

[0330]

初始溶液性质					
制剂	mOsm	pH	mg/mL	浊度	粘度(cP)
1	356	5.82	98	< III	3.1
2	312	6.13	88	< III	2.6
3	303	6.12	89	< III	2.6
4	305	6.05	88	< III	2.4
5	309	5.97	99	< III	2.8
6	306	6.03	88	< III	2.6
CTL / 0	197	6.01	100	< III	2.8

[0331] 借由通过 SE-HPLC 测定的 HMW 百分比和 LMW 百分比评估了高浓度液体的稳定性。将这些材料置于 5°C、25°C 和 40°C 达 3 个月。40°C 2 周的数据示于图 15。

[0332] 在 40°C 观察到降解产物中的一些注意得到的变化, 40°C 对于液体是应激条件。简短加速的稳定性 (在 40°C 下 2 周) 显示制剂 4、5 和 6 提供了与对照 (10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯-80, pH 6.0) 相比相当的或改进的稳定性。制剂 1、2 和 3 似乎对稳定性显示出负面影响。

[0333] 该数据显示甘氨酸、甲硫氨酸和增加的蔗糖对于高浓度 TNF 结合性纳米抗体液体制剂是稳定化的。该数据显示在一些条件下精氨酸碱、盐酸精氨酸和氯化钠对于高浓度 TNF 结合性纳米抗体液体制剂可能是去稳定化的。

[0334] 实施例 6: 高浓度液体制剂的 TNF 结合性纳米抗体的稳定性, 短期 (2 周期间), 组氨酸和 Tris 缓冲液

[0335] TNF 结合性纳米抗体作为液体的稳定性在以下图 16-19 中示例。检查了两种制剂: 20mM 组氨酸、5%蔗糖、pH 6.0 中 118mg/mL 的 ATN-103; 和 20mM Tris, 5%蔗糖、pH 7.2 中 117mg/mL 的 ATN-103。所述制剂的稳定性借由通过 SE-HPLC 测定的 HMW 百分比和 LMW 百分比, 以及通过 CEX-HPLC 测定的酸性物质百分比和碱性物质百分比测定。该数据显示作为储存时间的函数的降解产物在 4°C 变化有限。在 40°C 观察到降解产物中一些注意得到的变化, 40°C 对于液体是应激条件。该数据显示在组氨酸和 Tris 缓冲液中的 TNF 结合性纳米抗体的稳定性在这些配制条件下基本上相似, 其中组氨酸的表现稍微更为有利 (LMW 稍少)。制剂活性在稍后测定: 升高的 pH (7 或更高) 导致更大程度的 LMW 形成, 解释了以下观察到的优点。

[0336] 实施例 7 :TNF 结合性纳米抗体的高浓度液体制剂的稳定性 :界面应力 (冻 / 融) 评估

[0337] 图 20-23 证明 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80, pH 6.0 中约 80mg/mL 的液体 TNF 结合性纳米抗体制剂的稳定性。在从 -80℃ 到 37℃ 进行多个冻融循环之后基于体积排阻 -HPLC、浊度和浓度评估而进行评估。

[0338] 该数据显示从 -80℃ 到 37℃ 作为多个冻融循环的函数的稳定性变化有限。

[0339] 实施例 8 :TNF 结合性纳米抗体的高浓度液体制剂的稳定性 :对制造过程中可能遇到的短期热应激的评估

[0340] 图 24 显示液体 TNF 结合性纳米抗体对于可能在药物物质和药物产品制造工艺中潜在遇到的短期热应激是鲁棒的。在 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80, pH 6.0 中以约 80mg/mL 和 50mg/mL 研究了高浓度液体。在 40℃ 暴露 8 小时、25℃ 暴露 7 天和在 5℃ 暴露 29 天之后,基于体积排阻 -HPLC 测定的 HMW 百分比和 LMW 百分比进行评估。该数据显示在 5℃ 和 25℃ 下作为储存时间的函数的聚集体变化有限。在 40℃ 观察到一些聚集体的变化,40℃ 对于液体是应激条件。

[0341] 在指明的温度和持续时间,通过 SE-HPLC 测定的 TNF 结合性纳米抗体高浓度液体的 LMW 物质百分比在检出限以下 (即 0.0%)。

[0342] 实施例 9 :ATN-103 的低浓度液体制剂的稳定性 :最优 pH 和制剂的评估

[0343] 图 25-28 证明在 pH 5.5、6.0、6.5 和 7.0 缓冲的低浓度 (约 1mg/mL) 液体 TNF 结合性纳米抗体制剂的稳定性。将低浓度液体 TNF 结合性纳米抗体响应于应激如暴露于 40℃ 的温度 (图 25 和 26)、振荡 (图 28) 和冻 / 融的稳定性作为制剂和 pH 的函数检查。对以下三种制剂中的每一种评估了四种 pH :10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80 ;10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、150mM 盐酸精氨酸 ;和 10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、75mM 氯化钠。在这组数据中, Tween-80 作为聚山梨酯 -80 的别名使用。研究样品使用 SE-HPLC 和 UV 评估 (对于浓度和浊度二者 - 通过 A455 测量)。

[0344] 图例 :

[0345] HST :10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80

[0346] HSTA :10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、150mM 盐酸精氨酸

[0347] HSTS :10mM 组氨酸、5%蔗糖、0.01% Tween-80、75mM 氯化钠

[0348] 结果显示 5.5-7.0 的 pH 范围适合于所述制剂。该数据显示在一些条件下, pH 7.0 可能显示一些有害作用 (低分子量物质增加)。该数据显示向药物物质制剂加入盐酸精氨酸或氯化钠没有显著益处,并且在一些情况下可能会去稳定化。

[0349] 图 27 显示在 4℃ 储存之后对于 TNF 结合性纳米抗体通过 SE-HPLC 测定的 HMW 物质的百分比,其中在 4 周之后基本上未观察到变化。在 4℃ 对于所有测试的溶液条件对于低浓度的 TNF 结合性纳米抗体通过 SE-HPLC 测定的 LMW 物质的百分比在检出限以下 (即 0.0%)。通过 SE-HPLC 或 UV A280 或 A455 均未在 HMW 或 LMW 物质中观察到因多个冻融循环造成的显著变化。

[0350] 实施例 10 :低浓度 TNF 结合性纳米抗体液体 :作为 pH 和制剂的函数评估振荡的效果

[0351] 还呈现了数据来显示 TNF 结合性纳米抗体对于在这种 pH 范围内在 300rpm 振荡 4

小时（在 15°C）是敏感的（图 28）。含有氯化钠和精氨酸的制剂对于振荡尤其敏感。组氨酸、蔗糖、Tween-80 制剂在各个 pH 组内显示了最少的高分子量降解。组氨酸、蔗糖、Tween-80 制剂在 pH 6.0 和 7.0 显示了最少的 HMW 降解。

[0352] 在 280nm（以监测浓度）和 455nm（以监测浊度）监测低浓度 TNF 结合性纳米抗体在振荡之后的 UV 吸光度。未观察到因振荡造成的显著变化。

[0353] 在多个冻融循环之后通过 SE-HPLC 和在 280nm（为监测浓度）及 455nm（为监测浊度）的 UV 分析检查了低浓度 TNF 结合性纳米抗体溶液。在 SE-HPLC 或 UVA280 或 A455 中未观察到因多个冻融循环造成的显著变化。

[0354] 实施例 11：高浓度液体制剂的 TNF 结合性纳米抗体的稳定性，短期（2 周持续时间），检查张度调节剂

[0355] TNF 结合性纳米抗体作为液体的稳定性在以下示例：

[0356] 检查了 5 种制剂，如图 31 和 32 所示，在本文中称作 HST、HSGT、HSGMT、HSorb 和对照。下文描述检查的每种制剂。

[0357]

图 31 和 32	制剂
HST	100 mg/mL TNF 结合性纳米抗体、20 mM 组氨酸、8%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80
HSGT	100 mg/mL TNF 结合性纳米抗体、20 mM 组氨酸、5%蔗糖、80 mM 甘氨酸、0.01%聚山梨酯 80
HSGMT	100 mg/mL TNF 结合性纳米抗体、20 mM 组氨酸、5%蔗糖、80 mM 甘氨酸、10 mM 甲硫氨酸、0.01%聚山梨酯 80
HSorb	100 mg/mL TNF 结合性纳米抗体、20 mM 组氨酸、5%山梨糖醇
对照	100 mg/mL TNF 结合性纳米抗体、20 mM 组氨酸、5%蔗糖

[0358] 将所述制剂作为液体在 4°C 和 40°C（应激条件）储存在聚丙烯管中和在带橡胶塞的环烯烃共聚物预填式注射器中两周。

[0359] 借由通过 SE-HPLC 测定的 HMW 百分比和 LMW 百分比评估制剂的稳定性，如图 31 和 32 所示。该数据显示在 4°C 作为储存时间的函数的降解产物的变化有限。对于图 32 中显示的样品，在初始时间点或在 4°C 2 周之后没有检测到 LMW。仅在 40°C（应激的）样品中检测到了 LMW。数据显示全部五种制剂在应激条件 40°C 显示了作为储存时间的函数的降解产物可比较的（comparable）变化。因此，该数据证明所有制剂均适用于液体剂型。

[0360] 实施例 12：低浓度和高浓度液体制剂的 TNF 结合性纳米抗体的稳定性，确认目标制剂，并检查初级包装容器（primary packaging container）

[0361] TNF 结合性纳米抗体作为液体的稳定性在以下示例：

[0362] 检查了三种制剂：

[0363] (a) 10mg/mL TNF 结合性纳米抗体、20mM 组氨酸、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80；

[0364] (b) 50mg/mL TNF 结合性纳米抗体、20mM 组氨酸、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80；

[0365] (c) 100mg/mL TNF 结合性纳米抗体、20mM 组氨酸、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨酯 80。

[0366] 将所述制剂在以下初级包装容器中制备：

[0367] (a) 来自一个供应商的 I 型可预充式药品级玻璃注射器和 West 4432 硅化灰色橡胶塞

[0368] (b) 来自第二供应商的 I 型可预充式药品级玻璃注射器和 West 4432 硅化灰色橡胶塞

[0369] (c) 预充式环烯烃共聚物和 West 4432 硅化灰色橡胶塞

[0370] 在 $t = 0$ 分析制剂并且感到满意。所述制剂已经在 4°C、25°C 和 40°C 储存了 3 个月。

[0371] 等效物

[0372] 本文引用的所有参考文献通过提述以其整体并入，并且与各篇单独的出版物或专利或专利申请具体并单独指明通过提述以其整体并入用于各种目的相同的程度用于各种目的。

[0373] 本发明不限于本文描述的具体实施方案的范围。事实上，除了本文描述的修饰之外根据前述说明书和附图对本发明的多种修饰对于本领域技术人员会是显而易见。意图使这些修饰落入所附权利要求的范围内。

[0001]

序列表

<110> 惠氏有限责任公司 (WYETH)
 <120> 单域抗原结合性分子的制剂
 <130> W2023-7039W0
 <140>
 <141>
 <150> 61/109,474
 <151> 2008-10-29
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成多肽"
 <220>
 <221> 信号
 <222> (1)..(19)
 <220>
 <221> 成熟肽(mat_peptide)
 <222> (20)..(382)
 <400> 1
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 -15 -10 -5
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 1 1 5 10
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 30 35 40 45
 Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro
 50 55 60
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 65 70 75
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr
 95 100 105

[0002]

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
 110 115 120 125
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
 130 135 140
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
 145 150 155
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 160 165 170
 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 175 180 185
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
 190 195 200 205
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 210 215 220
 Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 240 245 250
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 255 260 265
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val
 270 275 280 285
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr
 290 295 300
 Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 305 310 315
 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 320 325 330
 Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser
 335 340 345
 Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 350 355 360

<210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0003]

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成肽"

<400> 2
 Asp Tyr Trp Met Tyr
 1 5

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成肽"

<400> 3
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成肽"

<400> 4
 Ser Pro Ser Gly Phe Asn
 1 5

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成肽"

<400> 5
 Ser Phe Gly Met Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成肽"

<400> 6
 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

[0004]

Gly

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成肽"

<400> 7
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg
 1 5

<210> 8
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成多肽"

<220>
 <221> 变体
 <222> (6)..(10)
 <223> /替代=" "

<220>
 <221> misc feature
 <222> (6)..(10)
 <223> /注释="序列中给出的残基就对于所述位置的注解中那些而言没有任何偏好"

<220>
 <221> 变体
 <222> (11)..(15)
 <223> /替代=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(15)
 <223> /注释="序列中给出的残基就对于所述位置的注解中那些而言没有任何偏好"

<220>
 <221> 变体
 <222> (16)..(20)
 <223> /替代=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(20)
 <223> /注释="序列中给出的残基就对于所述位置的注解中那些而言没有任何偏好"

<220>
 <221> 变体
 <222> (21)..(25)
 <223> /替代=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> /注释="序列中给出的残基就对于所述位置的注解中那些而言没有任何偏好"

<220>

[0005]

<221> 变体
 <222> (26)..(30)
 <223> /替代=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(30)
 <223> /注释="序列中给出的残基就对于所述位置的注解中那些而言没有任何偏好"

<220>
 <221> 变体
 <222> (31)..(35)
 <223> /替代=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(35)
 <223> /注释="序列中给出的残基就对于所述位置的注解中那些而言没有任何偏好"

<400> 8
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser
 35

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成肽"

<400> 9
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="描述人工序列：合成多肽"

<220>
 <221> 变体
 <222> (21)..(25)
 <223> /替代=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> /注释="序列中给出的残基就对于所述位置的注解中那些而言没有任何偏好"

<220>
 <221> 变体
 <222> (26)..(30)
 <223> /替代=" "

[0006]

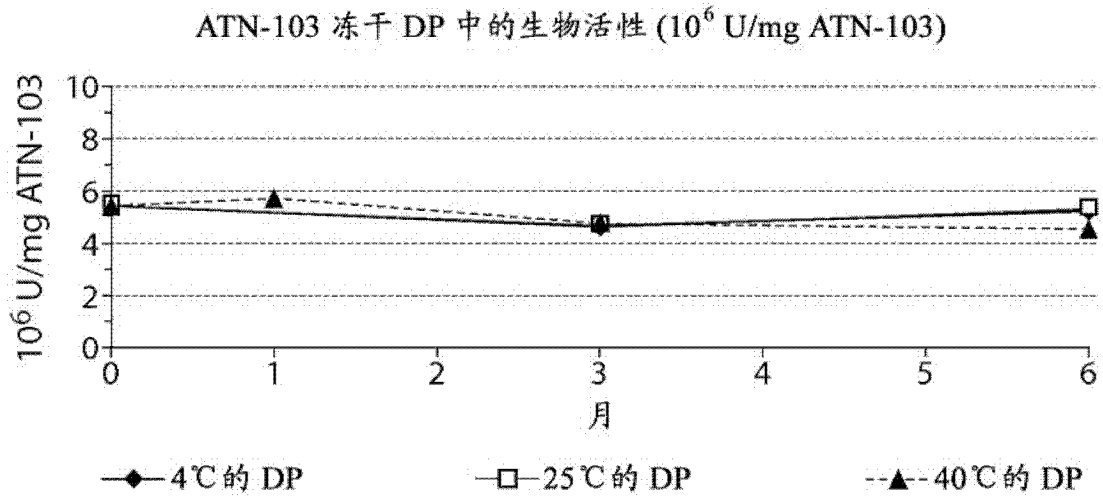


图 1

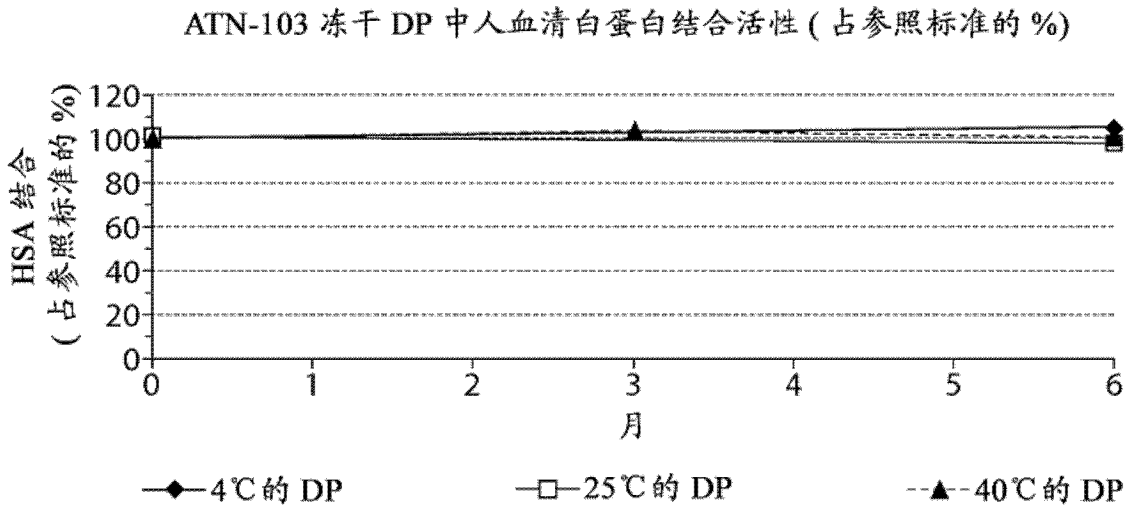


图 2

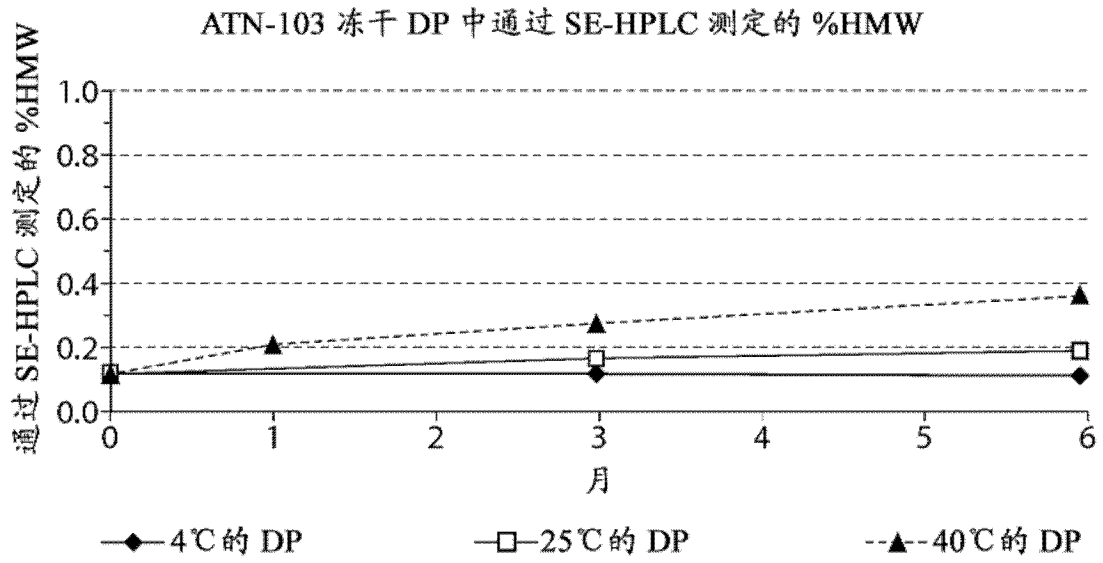


图 3

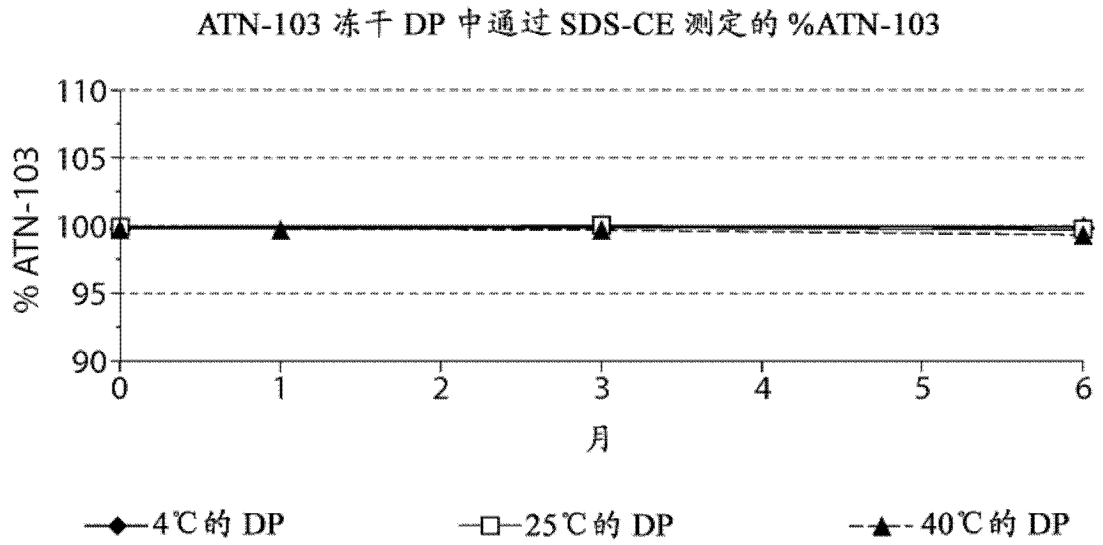


图 4

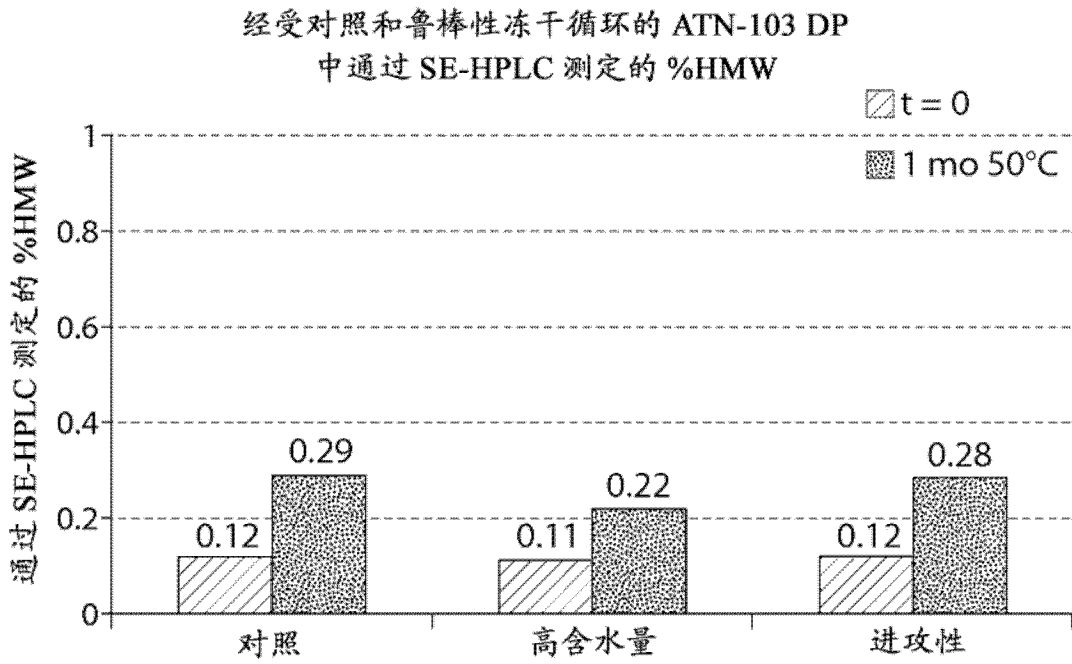


图 5

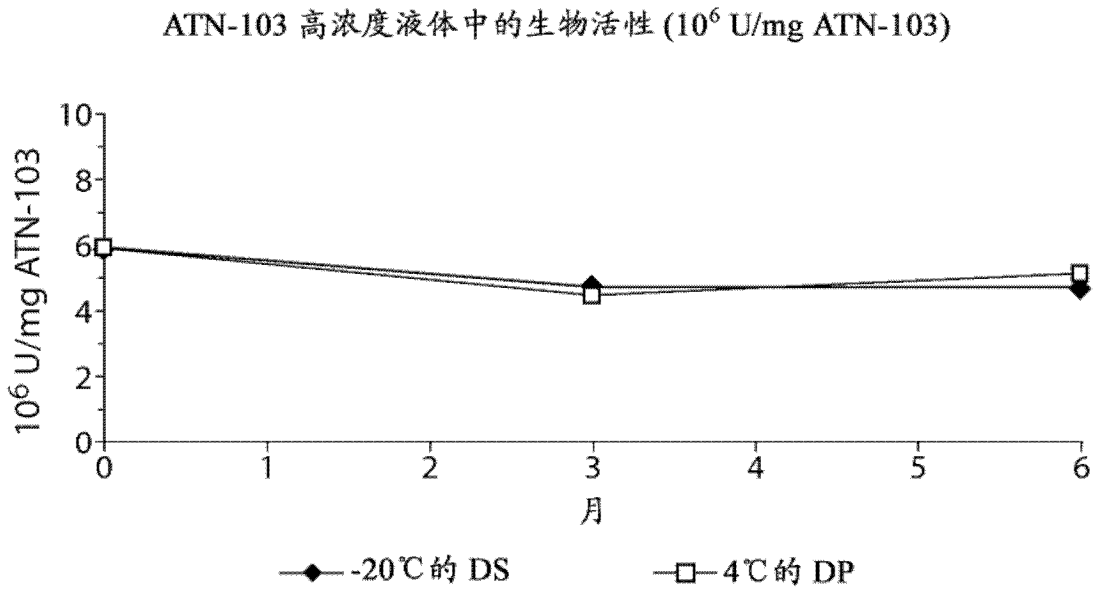


图 6

ATN-103 高浓度液体中的人血清白蛋白结合活性 (占参照标准的%)

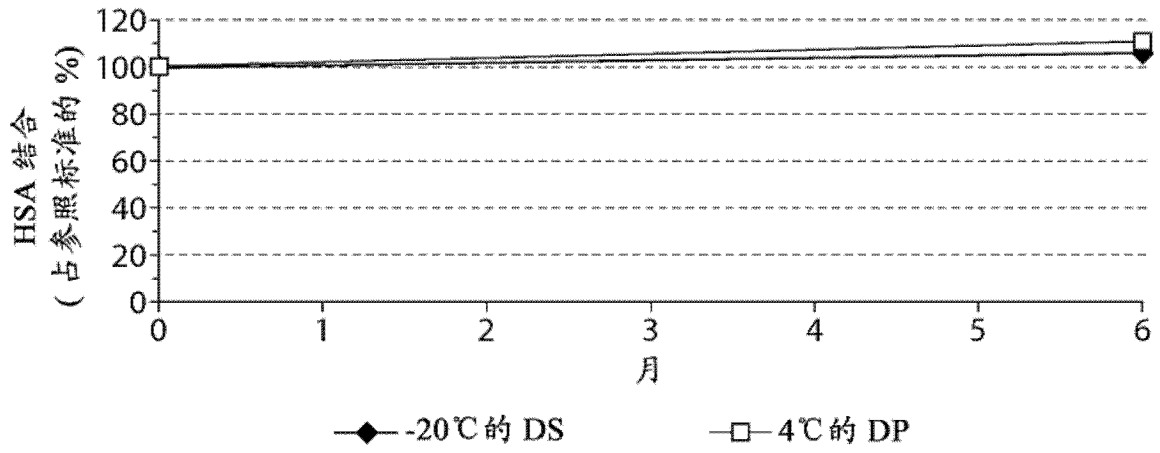


图 7

ATN-103 高浓度液体中通过 SE-HPLC 测定的 %HMW

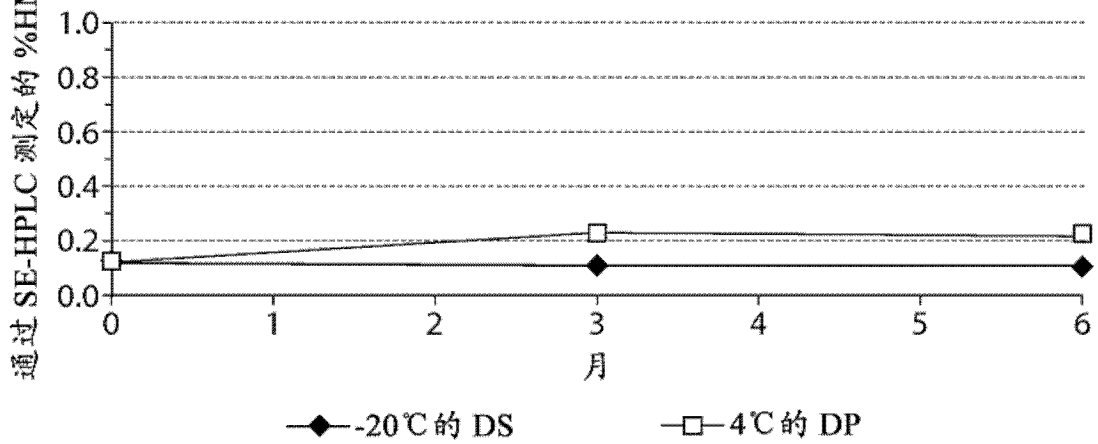


图 8

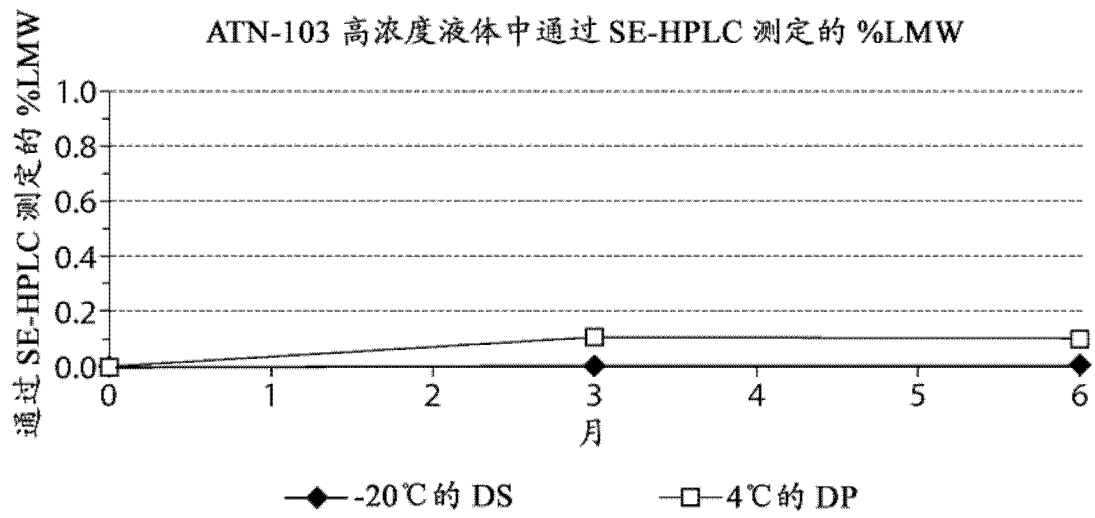


图 9

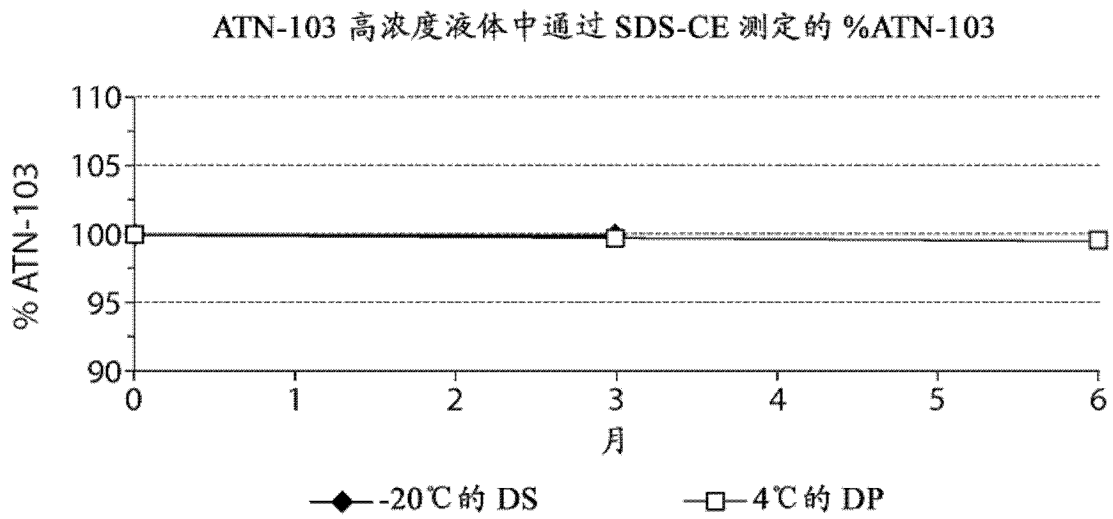


图 10

预充式注射器中 ATN-103 约 80 mg/mL
通过 SE-HPLC 测定的 %HMW

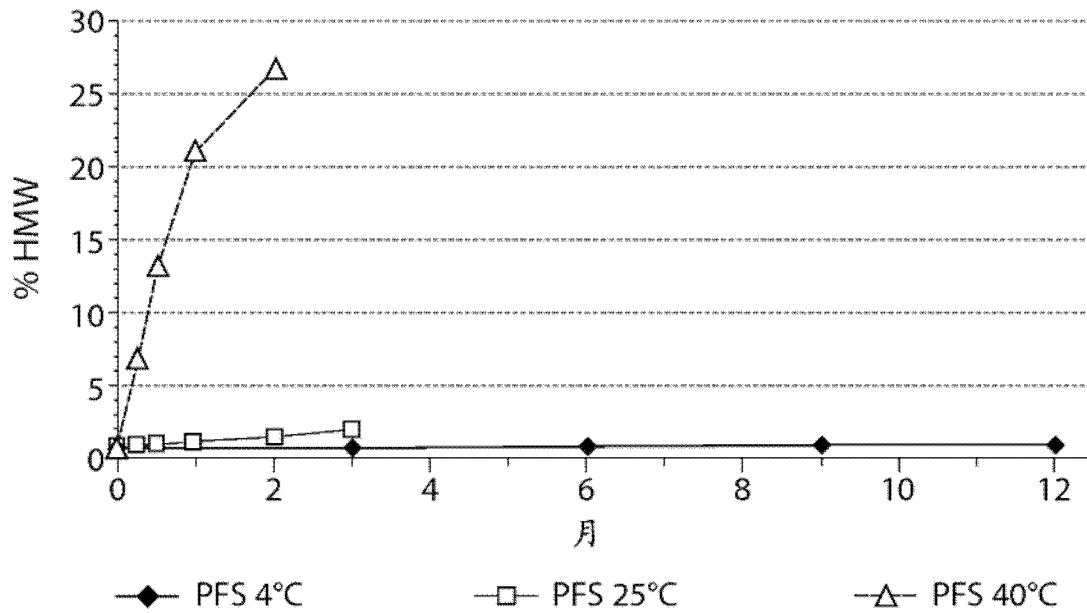


图 11

预充式注射器中 ATN-103 约 80 mg/mL
通过 SE-HPLC 测定的 %LMW

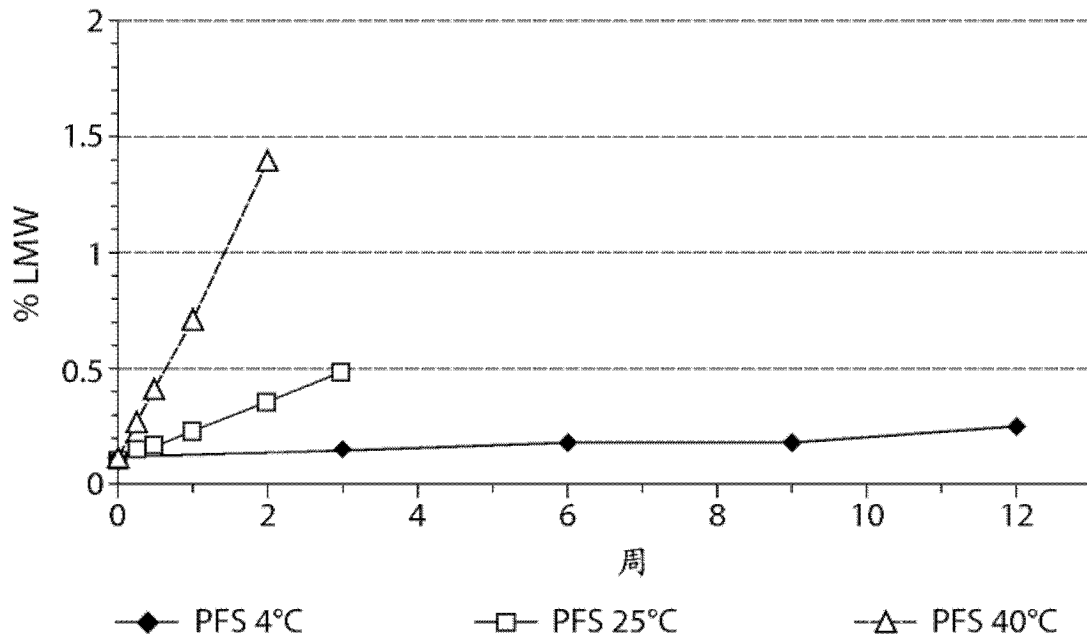


图 12

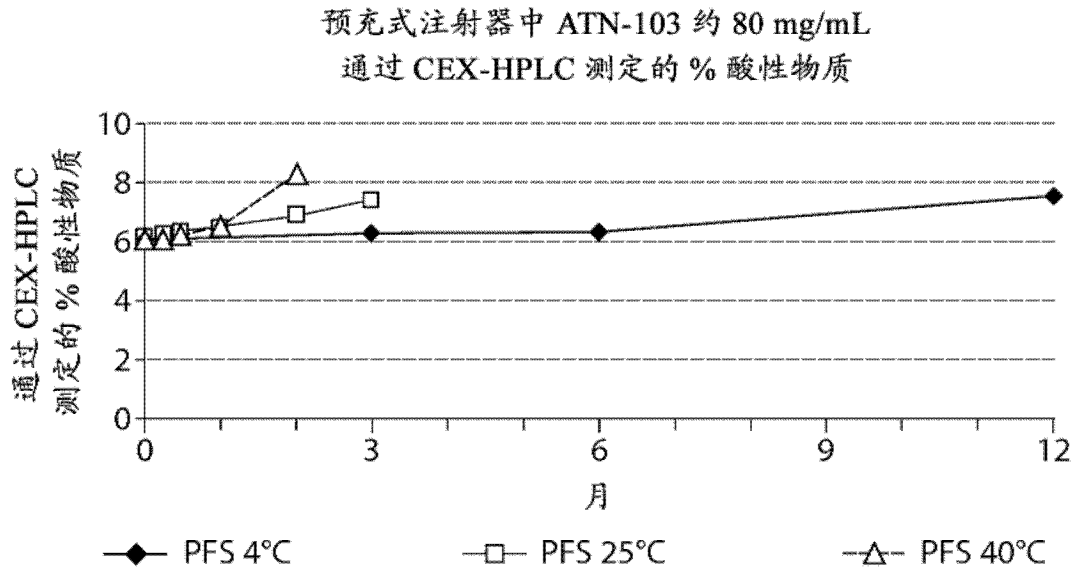


图 13

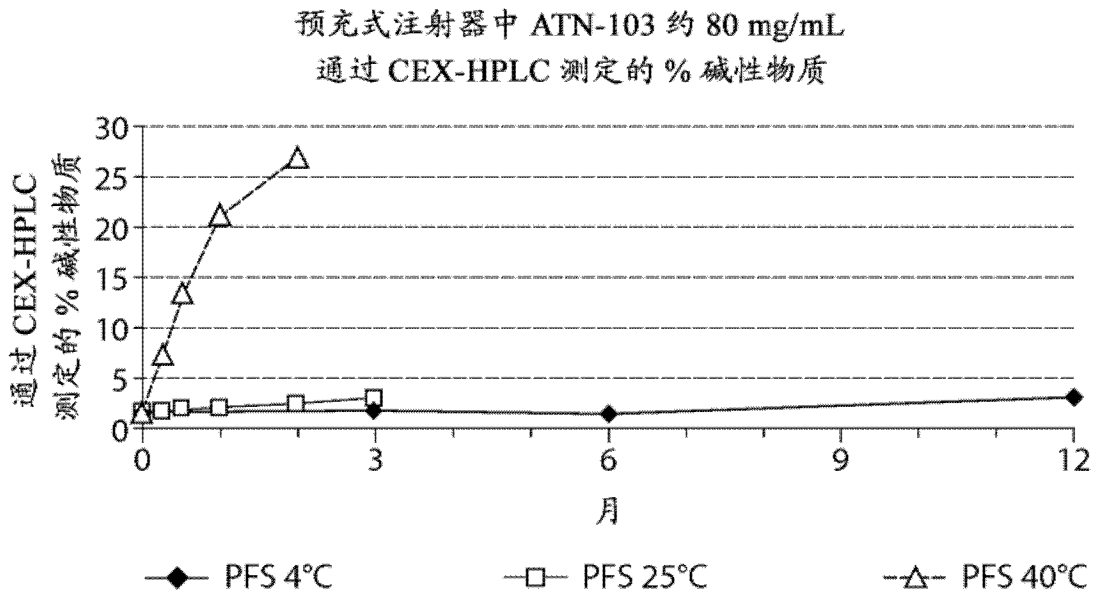


图 14

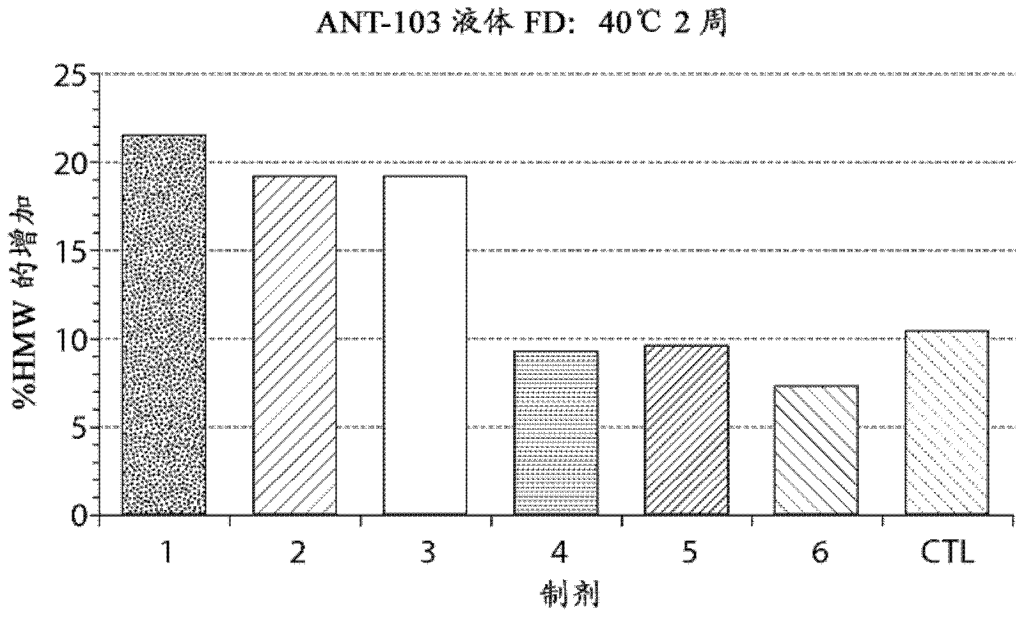


图 15

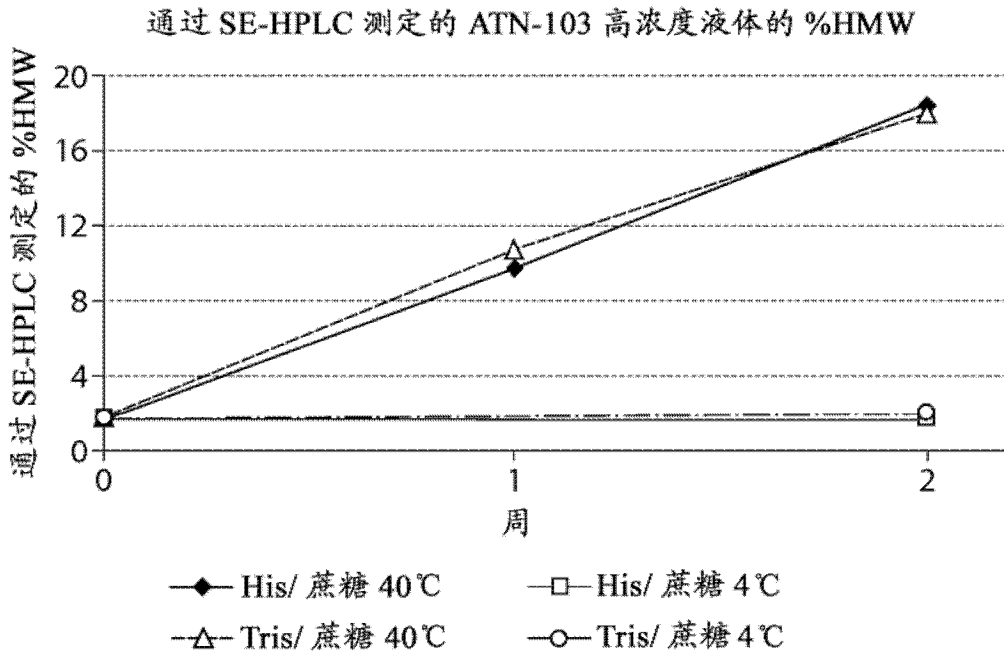


图 16

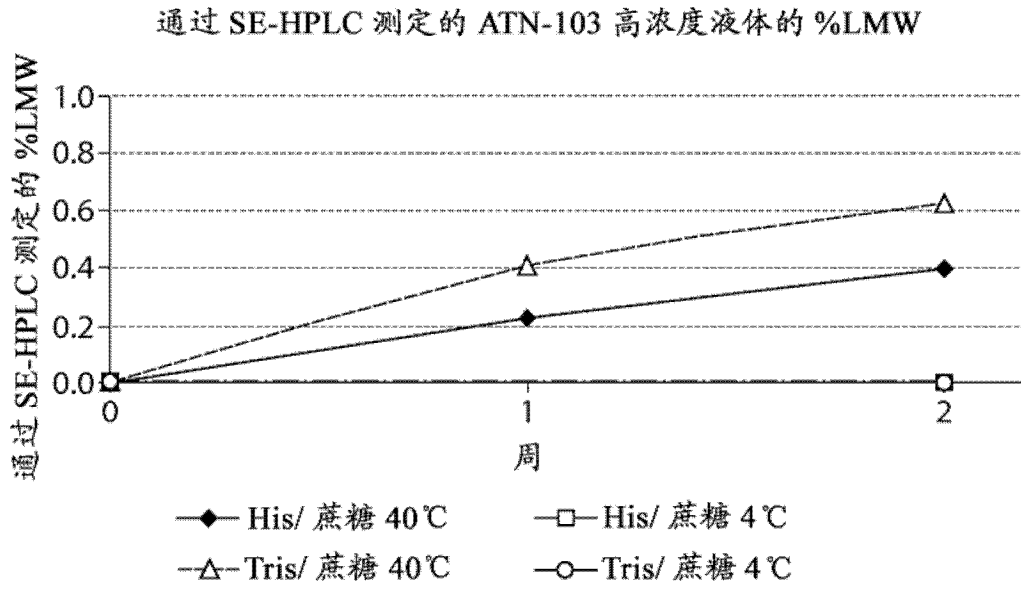


图 17

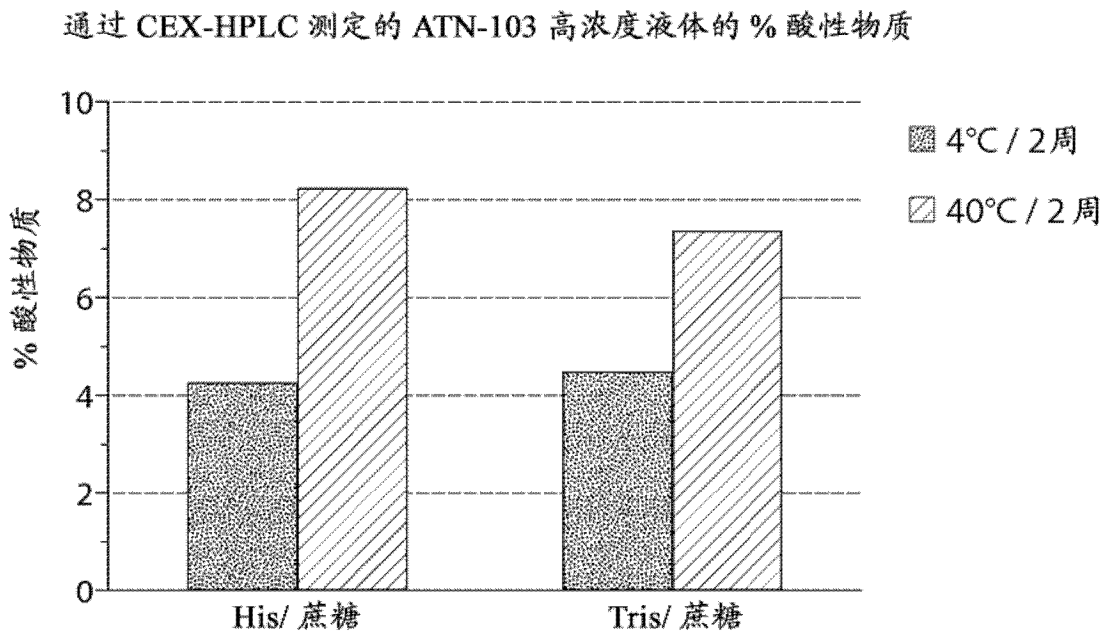


图 18

通过 CEX-HPLC 测定的 ATN-103 高浓度液体的 % 碱性物质

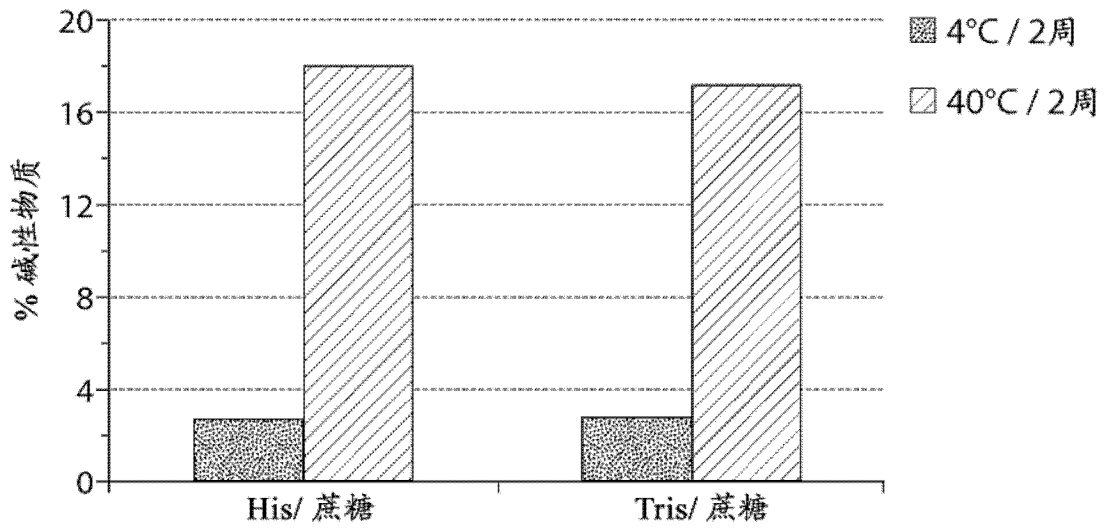


图 19

ATN-103 液体 约 80 mg/mL
冷冻 -80°C / 融化 37°C
通过 SE-HPLC 测定的 %HMW

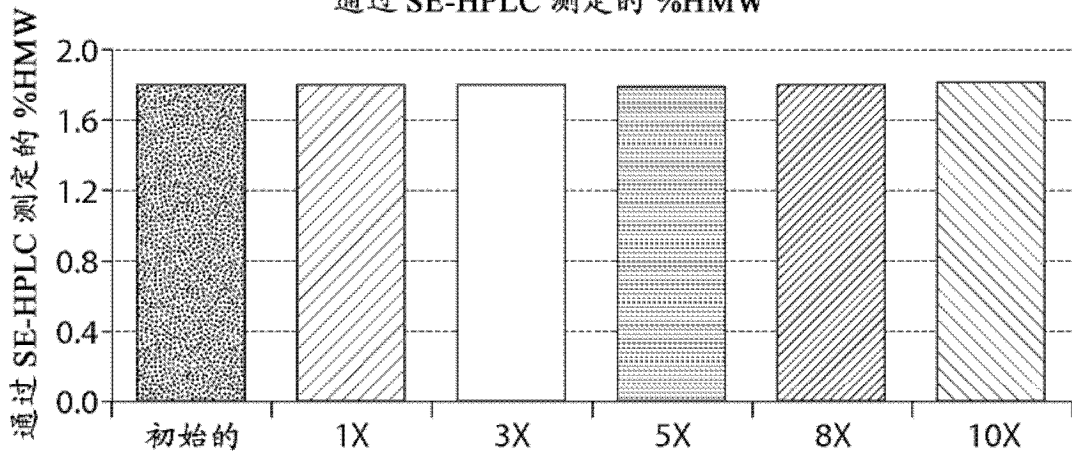


图 20

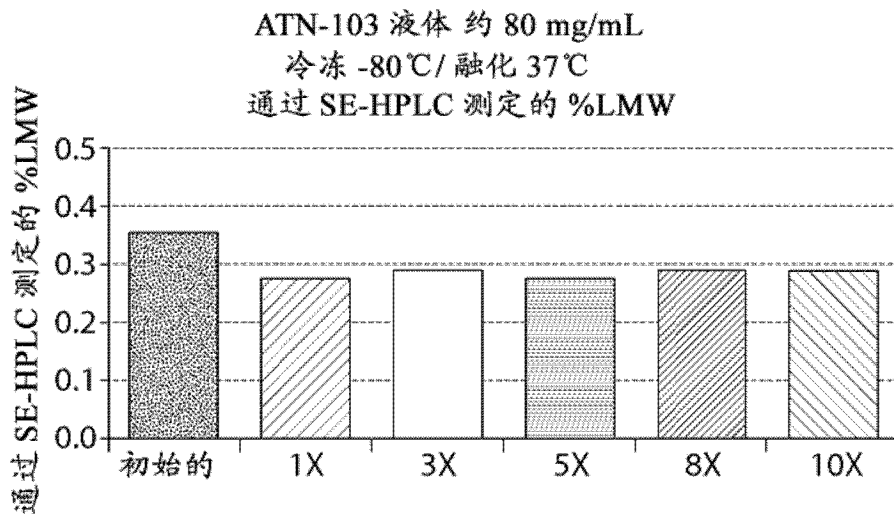


图 21

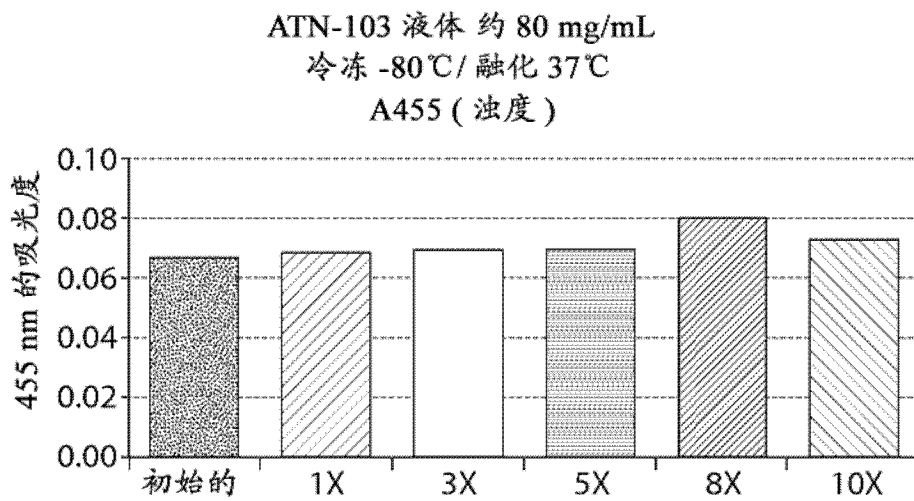


图 22

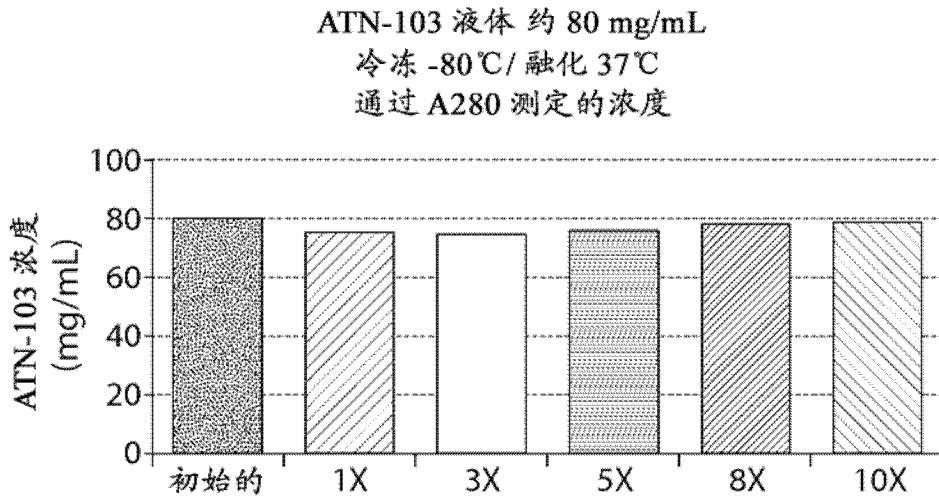


图 23

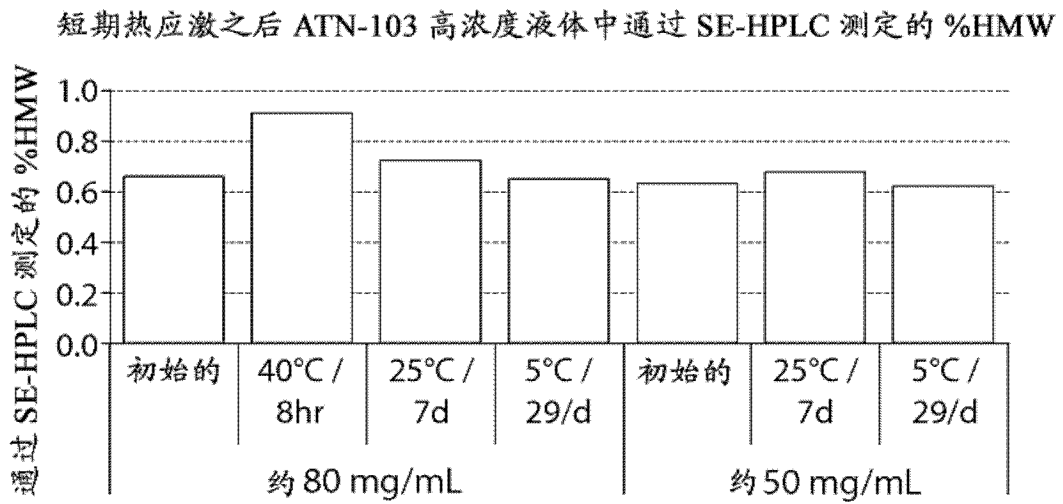


图 24

40°C的低浓度 ATN-103
通过 SE-HPLC 测定的 %HMW

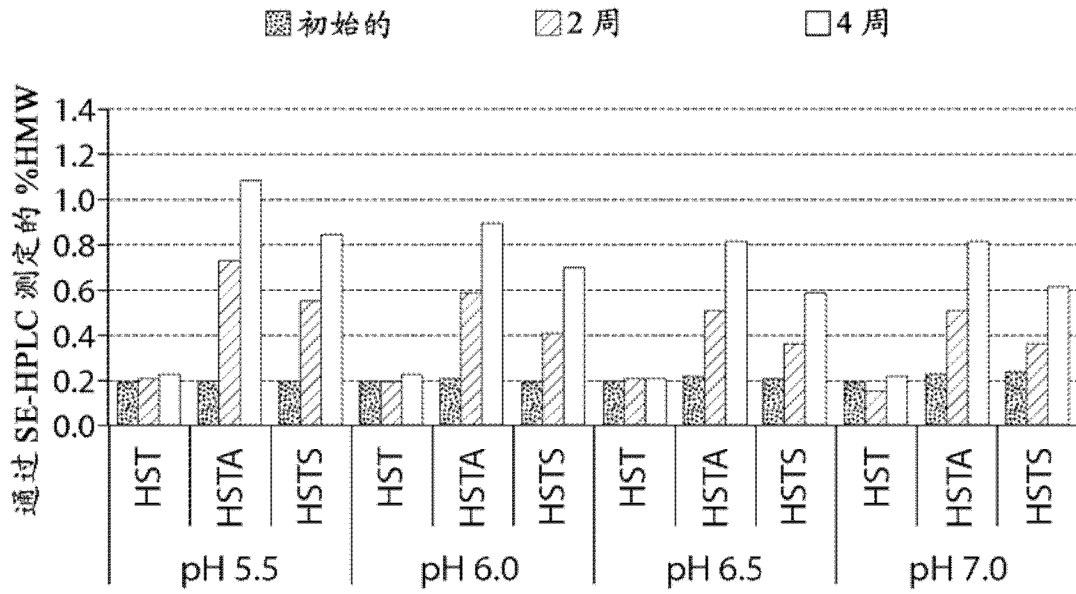


图 25

40°C的低浓度 ATN-103
通过 SE-HPLC 测定的 %LMW

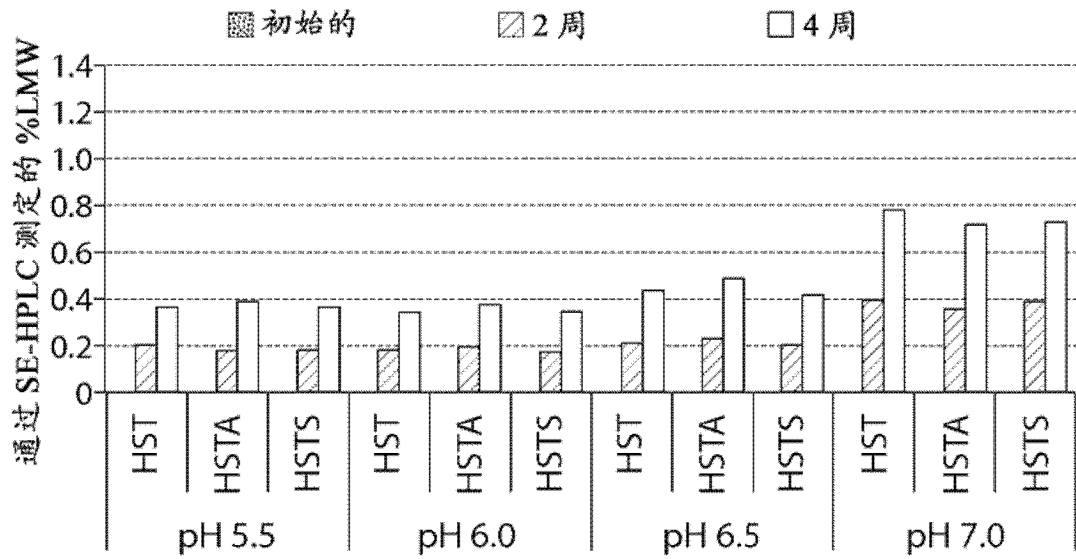


图 26

40°C的低浓度 ATN-103
通过 SE-HPLC 测定的 %HMW

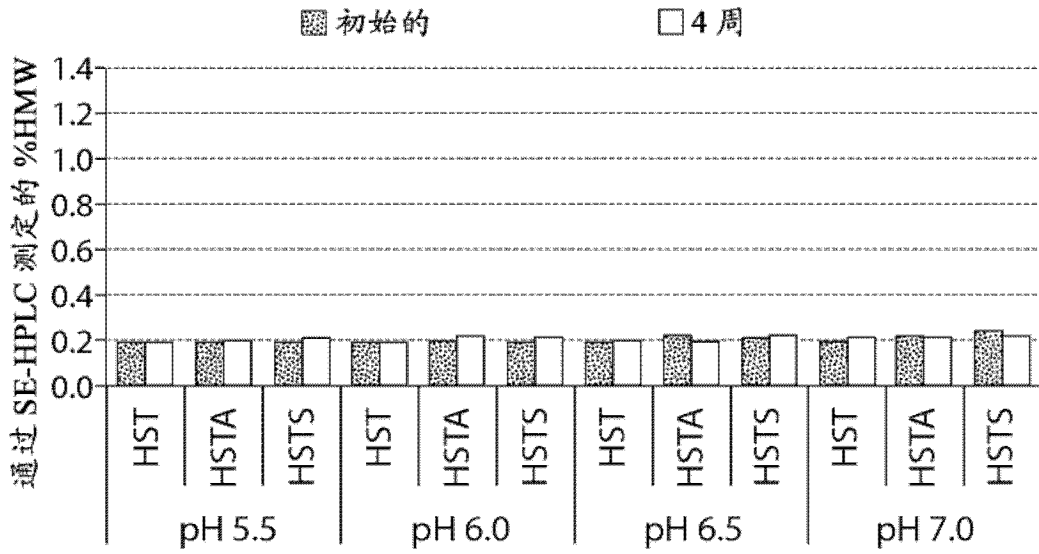


图 27

低浓度 ATN-103
振荡之后通过 SE-HPLC 测定的 %HMW

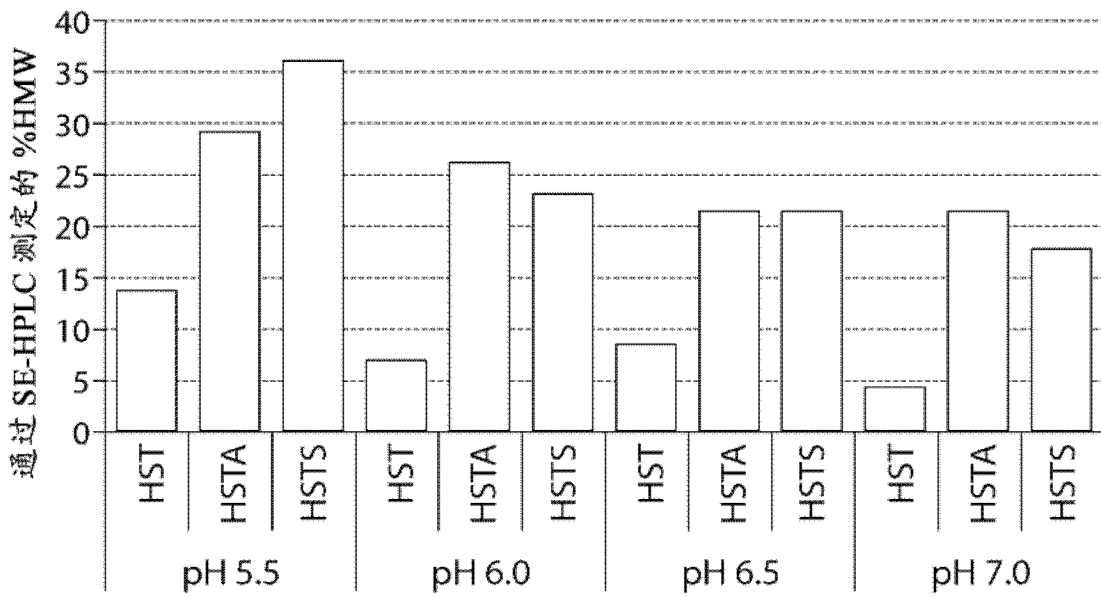


图 28

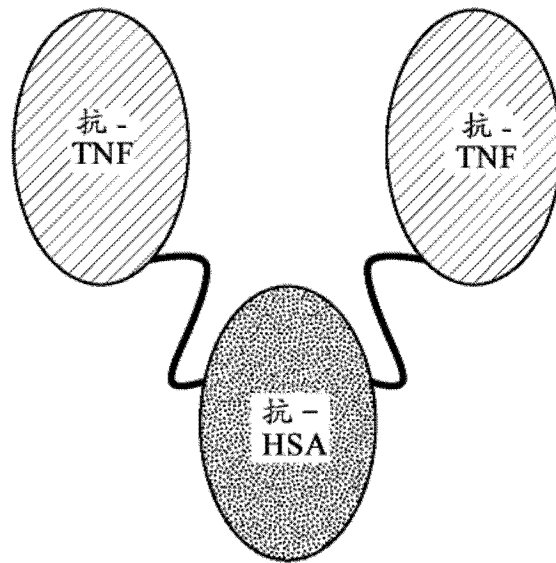


图 29

-19 MGWSCIILFLVATATGVHS -1

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY 60

61 PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLVTVSSGGGGS 120

121 GGGSEVQLVESGGGLVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS 180

181 DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSG 240

241 GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEIN 300

301 TNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLVT 360

361 VSS (SEQ ID NO:1)

图 30

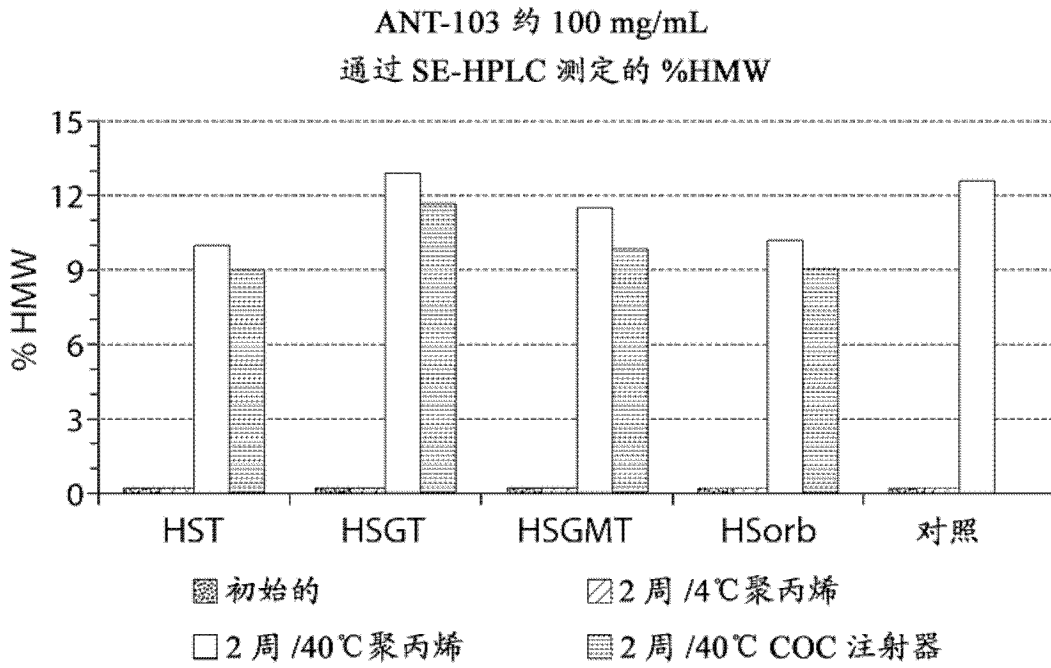


图 31

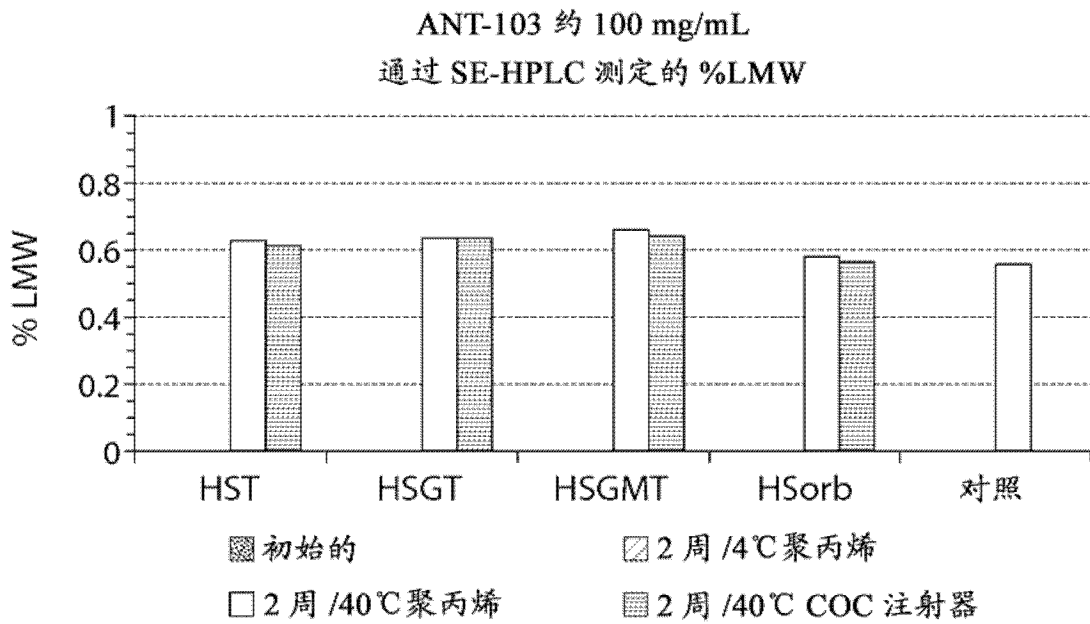


图 32