



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101778640 A

(43) 申请公布日 2010. 07. 14

(21) 申请号 200880102434. 5

(22) 申请日 2008. 06. 13

(30) 优先权数据

60/944, 076 2007. 06. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 02. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/066928 2008. 06. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02008/157356 EN 2008. 12. 24

(71) 申请人 比奥根艾迪克 MA 公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 凯文·马洛尼

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

C07K 16/28 (2006. 01)

A61P 25/00 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 35 页 序列表 4 页

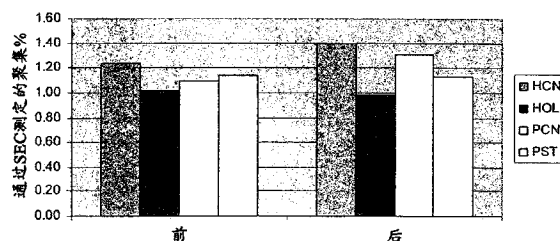
附图 5 页

(54) 发明名称

抗体制剂

(57) 摘要

描述了 VLA-4 结合抗体的制剂。



1. 一种含水药物组合物,其包含浓度约 120mg/mL 至约 190mg/mL 的 VLA-4 结合抗体,并且还包含甘油及具有约 pH 5 至约 pH 7 的磷酸盐缓冲液。
2. 一种含水药物组合物,其包含浓度约 120mg/mL 至约 190mg/mL 的 VLA-4 结合抗体,并且还包含 L- 精氨酸盐酸盐及具有约 pH 5 至约 pH 7 的磷酸盐缓冲液。
3. 一种含水药物组合物,其包含浓度约 120mg/mL 至约 190mg/mL 的 VLA-4 结合抗体,并且还包含氯化钠、聚山梨酯 80 及具有约 pH 5 至约 pH7 的磷酸盐缓冲液。
4. 如权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述 VLA-4 结合抗体为那他珠单抗。
5. 如权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述 VLA-4 结合抗体的浓度范围为约 130mg/mL 至约 180mg/mL。
6. 如权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述 VLA-4 结合抗体的浓度范围为约 140mg/mL 至约 160mg/mL。
7. 如权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述 VLA-4 结合抗体的浓度为约 150mg/mL。
8. 如权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述组合物的 pH 为约 6 ± 0.5 。
9. 如权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述磷酸盐缓冲液为在约 5mM 与约 30mM 之间的磷酸钠缓冲液。
10. 如权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述磷酸盐缓冲液为约 10mM 的磷酸钠缓冲液。
11. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物基本不含氯化钠。
12. 如权利要求 2 所述的组合物,其中所述组合物包含小于 60mM 的钠含量。
13. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其还包含表面活性剂。
14. 如权利要求 13 所述的组合物,其中所述表面活性剂选自聚山梨酯 80、单硬脂酸甘油酯、硬脂酸聚羟氧酯、聚桂醇及脱水山梨糖醇油酸酯组成的组。
15. 如权利要求 13 所述的组合物,其中所述表面活性剂为聚山梨酯 80。
16. 如权利要求 13 所述的组合物,其中所述表面活性剂以约 0.001% 至约 2.0% (w/v) 的量存在。
17. 如权利要求 13 所述的组合物,其中所述表面活性剂以约 0.04% (w/v) 的量存在。
18. 如权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述组合物适于皮下或肌肉内施用。
19. 如权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述组合物在约 2°C 至约 8°C 的温度下稳定至少 12 个月。
20. 如权利要求 3 所述的组合物,其包含 140mM 氯化钠。
21. 如权利要求 3 所述的组合物,其包含 0.04% 聚山梨酯 80 (w/v)。
22. 一种设计用于或适于皮下或肌肉内施用的递送装置,其中所述递送装置封装有或含有单位剂量的权利要求 1、2 或 3 所述的组合物。
23. 如权利要求 22 所述的递送装置,其中所述单位剂量向人类的施用将向人类递送每千克体重约 1.4mg/kg 至约 3.0mg/kg 的 VLA-4 结合抗体或其片段。
24. 如权利要求 22 所述的递送装置,其中所述单位剂量为约 0.25mL 至 1.5mL。
25. 如权利要求 22 所述的递送装置,其中所述单位剂量为约 1mL。
26. 如权利要求 22 所述的递送装置,其中所述单位剂量为约 120mg 至约 350mg。
27. 如权利要求 22 所述的递送装置,其中所述单位剂量为约 150mg。

28. 如权利要求 22 所述的递送装置,其中所述单位剂量为约 300mg。
29. 如权利要求 22 所述的递送装置,其中所述单位剂量被分成多份。
30. 如权利要求 22 所述的递送装置,其中所述单位剂量被分成两个半份,每个半份含有约 150mg VLA-4 结合抗体。
31. 一种指导需要 VLA-4 结合抗体疗法的患者治疗该患者的方法,所述方法包括 (i) 向该患者提供至少一单位剂量的权利要求 1、2 或 3 所述的组合物;及 (ii) 指导该患者以皮下方式自我施用所述至少一单位剂量。
32. 一种指导需要 VLA-4 结合抗体疗法的患者治疗该患者的方法,所述方法包括 (i) 向该患者提供至少两单位剂量的权利要求 1、2 或 3 所述的组合物;及 (ii) 指导该患者以皮下一次一剂量的方式自我施用所述单位剂量。
33. 如权利要求 31 所述的方法,其中所述患者具有炎性病症。
34. 如权利要求 31 所述的方法,其中所述患者具有选自多发性硬化症、哮喘、关节炎、糖尿病、纤维化及炎性肠病组成的组的病症。
35. 一种权利要求 1、2 或 3 所述的组合物的单位剂量,其中所述单位剂量为约 0.25mL 至 1.5mL。
36. 如权利要求 35 所述的单位剂量,其中所述单位剂量为约 1mL。
37. 一种权利要求 1、2 或 3 所述的组合物的单位剂量,其中所述单位剂量向人类的施用将向人类递送每千克体重约 1.4mg 至约 3.0mg 的 VLA-4 结合抗体或其片段。
38. 一种治疗患者的方法,其包括向所述患者施用权利要求 1、2 或 3 所述的组合物。
39. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述患者具有炎性病症。
40. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述患者具有选自多发性硬化症、哮喘、类风湿性关节炎、糖尿病或 Crohn 病组成的组的病症。
41. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述组合物按照方案施用。
42. 如权利要求 38 所述的方法,其还包括选择适合以所述组合物治疗的患者。
43. 如权利要求 42 所述的方法,其中所述患者具有多发性硬化症,且适于治疗的患者已显示对多发性硬化症的在先替代治疗的不充分反应。
44. 如权利要求 38 所述的方法,其还包括向所述患者施用第二治疗剂,例如溶血栓剂、神经保护剂、抗炎剂、类固醇、细胞因子或生长因子。
45. 一种评估患者的方法,其包括 (i) 确定所述患者是否符合预先选定的标准,及 (ii) 如果所述患者符合所述预先选定的标准,则向所述患者批准、提供、指定或施用权利要求 1、2 或 3 所述的组合物。
46. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述患者具有多发性硬化症,且所述患者已对多发性硬化症的在先替代治疗具有不充分反应。
47. 一种含水药物组合物,其包含 135mg/mL 至 165mg/mL 那他珠单抗、5mM 至 15mM 磷酸钠缓冲液、130mM 至 150mM 氯化钠及 0.02% 至 0.08% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 为 6 $\pm$ 0.5。
48. 一种含水药物组合物,其包含 135mg/mL 至 165mg/mL 那他珠单抗、5mM 至 15mM 磷酸钠缓冲液、250mM 至 300mM 甘油及 0.02% 至 0.08% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 为 6 $\pm$ 0.5。
49. 一种含水药物组合物,其包含 135mg/mL 至 165mg/mL 那他珠单抗、5mM 至 15mM 磷酸钠缓冲液、150mM 至 170mM L-精氨酸盐酸盐及 0.02% 至 0.08% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 为

6±0.5。

50. 一种制备于磷酸盐缓冲液中包含 120mg/mL 至 190mg/mL VLA-4 结合抗体及聚山梨酯的含水组合物的方法,其包括:

- (i) 使所述抗体在细胞培养物中表达,
- (ii) 使所述抗体经历至少一个层析纯化步骤,
- (iii) 使所述抗体经历磷酸盐缓冲液中的至少两个超滤 / 透析过滤步骤,
- (iv) 使所述抗体经历磷酸盐缓冲液中的至少一个超滤步骤,及
- (v) 通过添加聚山梨酯及磷酸盐缓冲液将所述抗体的浓度调节为 120mg/mL 至 190mg/mL。

51. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述 VLA-4 结合抗体为那他珠单抗。

52. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述聚山梨酯为聚山梨酯 80。

53. 一种评估权利要求 1、2 或 3 的组合物的质量的方法,其包括:评估所述组合物的溶液参数,确定所述溶液参数是否符合预先选定的标准,并且如果所述溶液参数符合所述预先选定的标准,则确定所述组合物的质量适于使用。

54. 如权利要求 53 所述的方法,其中所述溶液参数为颜色。

55. 如权利要求 54 所述的方法,其中所述溶液参数为透明度。

56. 如权利要求 55 所述的方法,其中所述溶液参数为粘度。

抗体制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 6 月 14 日提交的序号为 60/944,076 的美国临时申请的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 背景

[0004] 多发性硬化症 (MS) 为中枢神经系统最常见疾病中的一种。现今全世界超过 2,500,000 个人患有 MS。

[0005] 概述

[0006] 本发明部分是基于对含有高浓度 VLA-4 结合抗体的制剂的开发。一些实施方案适于通过皮下 (SC) 或肌肉内 (IM) 递送来递送至受治疗者,诸如人类,例如人类患者。制剂例如当稀释于可接受的输注基质 (诸如生理盐水) 中时亦适于静脉内 (IV) 施用。举例而言, VLA-4 结合抗体可为那他珠单抗 (natalizumab), 且抗体浓度介于约 120mg/mL 至约 190mg/mL 的范围内。制剂对炎性、免疫或自体免疫病症提供治疗作用。举例而言,制剂可对中枢神经系统 (CNS) 炎性病症,诸如多发性硬化症 (MS) 提供治疗作用。

[0007] 一方面,本发明特征为含水药物组合物,诸如稳定含水药物组合物,其含有浓度为约 120mg/mL 至约 190mg/mL (例如浓度为约 135mg/mL, 约 140mg/mL, 约 150mg/mL, 约 160mg/mL 或约 165mg/mL) 的 VLA-4 结合抗体,及具有约 pH 5.5 至约 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液。在一些实施方案中, VLA-4 抗体浓度为约 130mg/mL 至约 180mg/mL 或约 140mg/mL 至约 160mg/mL。在一实施方案中, VLA-4 抗体浓度大于约 150mg/mL, 例如其在大于约 150mg/mL 至约 190mg/mL 的范围内。在一实施方案中, VLA-4 抗体浓度为约 150mg/mL。

[0008] 在一实施方案中, VLA-4 结合抗体为人源化单克隆抗体,诸如那他珠单抗。在另一实施方案中, VLA-4 结合抗体为那他珠单抗的变体。举例而言,在一些实施方案中,抗体的轻链可变区具有与那他珠单抗的轻链可变区拥有一或多个氨基酸残基但不多于 2、3、4、5 或 6 个氨基酸残基的差的氨基酸序列,且 / 或重链可变区具有与那他珠单抗的重链可变区拥有一或多个氨基酸残基但不多于 2、3、4、5 或 6 个氨基酸残基的差的氨基酸序列。在一些实施方案中,一些或所有差异均为保守性变化。

[0009] 在另一实施方案中, VLA-4 结合抗体拥有具有美国专利第 5,840,299 号 (其以引用的方式并入本文中) 中 SEQ ID NO:7 氨基酸序列的轻链可变区及具有美国专利第 5,840,299 号中 SEQ ID NO:11 氨基酸序列的重链可变区之一或两者。在其它实施方案中, VLA-4 抗体为这些抗体之一的变体。举例而言,在一些实施方案中,轻链可变区具有与美国专利第 5,840,299 号中 SEQ ID NO:7 的序列拥有一或多个氨基酸残基但不多于 2、3、4、5 或 6 个氨基酸残基的差的氨基酸序列,且 / 或重链可变区具有与由美国专利第 5,840,299 号中的 SEQ ID NO:11 所定义的序列拥有一或多个氨基酸残基但不多于 2、3、4、5 或 6 个氨基酸残基的差的氨基酸序列。

[0010] 在又一实施方案中, VLA-4 结合抗体具有表 1-1 中 SEQ ID NO:1 的轻链氨基酸序列及表 1-2 中 SEQ ID NO:2 的重链氨基酸序列之一或两者。在其它实施方案中, VLA-4 抗体为这些抗体之一的变体。举例而言,在一些实施方案中,抗体的轻链具有与 SEQ ID NO:

1 的序列拥有一或多个氨基酸残基但不多于 2、3、4、5 或 6 个氨基酸残基的差的氨基酸序列,且 / 或抗体的重链具有与 SEQ ID NO :2 的序列拥有一或多个氨基酸残基但不多于 2、3、4、5 或 6 个氨基酸残基的差的氨基酸序列。

[0011] 如用于本上下文中的氨基酸序列的“差异”指氨基酸同一性差异(例如,以不同氨基酸取代上文所提及的 SEQ ID NO :7 或 11 中的氨基酸)或缺失或插入。差异可位于例如框架区、CDR、铰链区或恒定区。差异可在蛋白质序列的内部或末端。在一些实施方案中,与前述序列相比,一些或所有差异均为保守性变化。

[0012] 在某些实施方案中,组合物的 pH 值为约 6.0 ± 0.5 (例如,约 5.0 ± 0.5 , 约 6.0 ± 0.5 , 约 7.0 ± 0.5), 且磷酸盐缓冲液组合物在约 5mM 与约 30mM 之间(例如,约 10mM, 约 15mM, 约 20mM, 约 25mM)。在另一实施方案中,组合物还包含浓度在约 100mM 与约 200mM (例如,约 120mM、140mM、160mM、180mM) 之间的盐,诸如氯化钠。在另一实施方案中,组合物包含 L- 精氨酸盐酸盐或甘油。在另一实施方案中,组合物含有浓度为约 200mM 至约 300mM (例如,约 220mM、240mM、260mM、280mM) 的氨基酸,诸如甘氨酸。在另一实施方案中,组合物含有约 0.001% 至约 2.0%、约 0.004% 至约 0.4%、约 0.008% 至约 0.2%、约 0.02% 至约 0.08% (w/v) (例如,约 0.01%、约 0.02%、约 0.03%、约 0.04%、约 0.05%、约 0.06%、约 0.07%、约 1%、约 1.5%) 的量的药学上可接受的赋形剂,诸如表面活性剂,诸如聚山梨酯 80。

[0013] 在某些实施方案中,组合物包括甘油,且基本不含 L- 精氨酸盐酸盐或氯化钠。在其它实施方案中,组合物包括 L- 精氨酸盐酸盐,但基本无甘油或氯化钠(除来自磷酸盐缓冲液及 L- 精氨酸盐酸盐中的以外)。在其它实施方案中,组合物包括氯化钠,但基本无甘油或 L- 精氨酸盐酸盐。

[0014] 在一些实施方案中,抗体制剂包括组氨酸缓冲液,例如代替磷酸盐缓冲液,且组氨酸缓冲液为约 pH 5 至约 pH 7 (例如,约 pH 5.5 ± 0.5 、pH 6 ± 0.5 或 pH 6.5 ± 0.5)。组氨酸缓冲液组合物是在约 10mM 与约 30mM 之间(例如,约 15mM、约 20mM、约 25mM)。组氨酸缓冲液制剂亦包括约 200mM 至约 300mM 甘油(例如,约 240mM、约 250mM、约 260mM、约 270mM、约 280mM 甘油)及约 0.001% 至约 2.0% (w/v) (例如,约 0.02%、约 0.03%、约 0.04%、约 0.05%、约 0.06%、约 0.07%、约 1%、约 1.5%) 的聚山梨酯 80。组氨酸制剂任选地包括约 5mM 至约 15mM 的 L- 甲硫氨酸(例如,约 10mM 的 L- 甲硫氨酸)。

[0015] 在一实施方案中,为本文特征的组合物含有 140mg/mL 至 160mg/mL 那他珠单抗、5mM 至 15mM 磷酸钠缓冲液、130mM 至 150mM 氯化钠及 0.01% 至 0.1% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 值为 6 ± 0.5 。在另一实施方案中,组合物含有 140mg/mL 至 160mg/mL 那他珠单抗、5mM 至 15mM 磷酸钠缓冲液、250mM 至 300mM 甘油及 0.01% 至 0.1% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 值为 6 ± 0.5 。在又一实施方案中,组合物含有 140mg/mL 至 160mg/mL 那他珠单抗、5mM 至 15mM 磷酸钠缓冲液、150mM 至 170mM L- 精氨酸盐酸盐及 0.01% 至 0.1% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 值为 6 ± 0.5 。

[0016] 在一实施方案中,为本文特征的组合物为液体。

[0017] 在另一实施方案中,组合物在约 2°C 至约 8°C (例如约 5°C) 的温度下稳定至少 12 个月(例如,至少 24、30、36 个月)。在另一实施方案中,组合物在环境温度(约 $20\text{--}30^{\circ}\text{C}$, 诸如约 25°C) 下稳定至少 2、3、4、5、6 或 7 天(例如,至少一周或 12 或 14 天)。

[0018] 在又一实施方案中,组合物适于 SC 或 IM 施用。在又一实施方案中,组合物适于 IV

施用。

[0019] 在另一方面中,本发明特征为制备含水组合物,诸如稳定含水组合物的方法,该组合物在磷酸盐缓冲液中包括约 120mg/mL 至约 190mg/mL 的 VLA-4 结合抗体及聚山梨酯。该方法包括使抗体在细胞培养物中表达,使抗体经历至少一个层析纯化步骤,使抗体经历磷酸盐缓冲液中的至少两个超滤/透析过滤步骤,使抗体经历磷酸盐缓冲液中的至少一个超滤步骤,且通过添加聚山梨酯和/或磷酸盐缓冲液来调节抗体浓度,例如下调至约 120mg/mL 至约 190mg/mL。在一实施方案中,VLA-4 结合抗体为那他珠单抗,且在另一实施方案中,聚山梨酯为聚山梨酯 80。抗体浓度可为例如约 135mg/mL 至约 165mg/mL,例如约 150mg/mL。在一些实施方案中,磷酸盐缓冲液包括其它赋形剂,诸如甘油、L-精氨酸盐酸盐或氯化钠。最终制剂具有约 5 至约 7,例如约 5.5 至约 6.5 的 pH 值。

[0020] 在另一方面中,本发明特征为设计用于或适于 SC 或 IM 施用的递送装置,其中该递送装置封装有或含有单位剂量的本文所述的组合物,例如含有适于 SC 或 IM 施用的那他珠单抗的浓缩制剂的组合物。在一实施方案中,单位剂量为约 100mg 至约 450mg (例如,约 120mg 至约 350mg;约 150mg、约 200mg、约 250mg、约 300mg)。在一实施方案中,单位剂量介于大于约 100mg 至约 450mg 的范围内。在另一实施方案中,单位剂量将向人类递送每千克体重约 1.4mg/kg 与约 3.0mg/kg 之间的 VLA-4 结合抗体或其片段。在另一实施方案中,单位剂量为约 0.25mL 至约 1.5mL (例如,约 0.5mL、约 0.75mL、约 1.0mL)。

[0021] 在一实施方案中,单位剂量为约 300mg 那他珠单抗,且在另一实施方案中,将单位剂量分成数份,诸如分成两个半份,每半份含有约 150mg VLA-4 结合抗体。在又一实施方案中,按照方案向患者施用那他珠单抗。在一实施方案中,每月一次向患者施用约 300mg 那他珠单抗,例如通过施用两个连续剂量的 150mg 那他珠单抗。在一替代性实施方案中,通过 150mg 那他珠单抗的第一剂,接着在约两周后 150mg 那他珠单抗的第二剂,每月向患者施用约 300mg 那他珠单抗。

[0022] 本发明特征为优化向患者提供例如那他珠单抗的 VLA-4 结合抗体的高度浓缩液体制剂的方法。

[0023] 在一实施方案中,该方法允许逐渐增大所提供抗体的浓度。这允许斜坡增大(ramp-up)抗体浓度且可允许在浓度增大时就耐受性、反应及类似情况来监测患者。举例而言,该方法可由向患者提供一或多个初始浓度或相对较低浓度的那他珠单抗开始,接着向患者提供最终较高浓度的那他珠单抗。就初始浓度而言,示例性制剂将通常具有小于最终较高浓度的 80%、70%、50%、30%、20% 或 10% 的抗体浓度。典型初始浓度可为例如 20mg/mL、30mg/mL 或 40mg/mL。典型最终浓度将为例例如约 120mg/mL 至约 190mg/mL (例如,约 135mg/mL、约 140mg/mL、约 150mg/mL、约 160mg/mL 或约 165mg/mL)。在一些实施方案中,患者将接受一次或在一个或多个初始浓度下的多次施用。举例而言,在一实施方案中,患者将历经多次施用接受渐增的浓度。在一些实施方案中,患者将在达到最终浓度之前接受在一或多个初始浓度下的 2、3、4、5、6、7 或 8 次施用。举例而言,患者将接受第一初始浓度下的一或多次施用,及第二较高浓度下的一或多次施用。在一些实施方案中,在一或多次施用之后评估患者的症状(包括不良症状)。在一些实施方案中,仅在确定患者对先前施用不具有不可接受的不良反应之后,向患者施用具有增大浓度的那他珠单抗的制剂。

[0024] 在一实施方案中,该方法允许逐渐增大所提供的抗体剂量(如本文所用的剂量是

指以一次或以所确定的小数字例如 2 次施用中每一次提供的抗体的量)。这允许斜坡增大剂量且可允许监测当剂量增大时患者的耐受性、不良反应及类似情况。举例而言,该方法可由向患者提供一或多个初始剂量或相对较低剂量的那他珠单抗开始,接着向患者提供最终较高剂量的那他珠单抗。典型初始剂量可为例如最终较高剂量的 80%、70%、50%、30%、20%或 10%或 10%或以下。典型最终剂量将基于达成稳态施用后的施用频率而变化。举例而言,一些实施方案包括在 75mg 与 500mg 之间的最终剂量(例如,100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg)(这些剂量通常可大致为每月施用剂量)。其它实施方案包括在 50mg 与 250mg 之间的最终剂量(例如,75mg、100mg、150mg、200mg)(这些剂量通常为每两周施用剂量)。其它实施方案包括在 25mg 与 150mg 之间的最终剂量(例如,50mg、75mg、100mg、125mg)(这些剂量通常为每周施用剂量)。在一些实施方案中,患者将接受一次或在一个或多个初始剂量下的多次施用。举例而言,在一实施方案中,患者将历经多次施用接受渐增的剂量。在一些实施方案中,患者将在达到最终剂量之前接受在一或多个初始剂量下的 2、3、4、5、6、7 或 8 次施用。举例而言,患者将接受第一初始剂量下的一或多次施用,及第二较高初始剂量下的一或多次施用。在一些实施方案中,在一或多次施用之后评估患者的症状(包括不良症状)。在一些实施方案中,仅在确定患者对先前剂量不具有不可接受的不良反应之后,向患者施用增大剂量的那他珠单抗。

[0025] 本发明亦包括例如起动包(starter pack)的试剂盒以实施浓度或剂量的斜坡增大。在一实施方案中,向患者或护理人员提供那他珠单抗制剂的试剂盒或“起动包”,其包括渐增浓度或剂量的那他珠单抗的包装。指导被提供起动包的患者或护理人员自我施用或施用第一、例如低或最低剂量或浓度的那他珠单抗,且等待指定的时间段。若患者未经历或经历较小程度的不良症状,则指导患者或护理人员自我施用或施用第二制剂,例如较高,例如下一个最高浓度或剂量。指导患者或护理人员继续逐步增大剂量或浓度直至达到所需剂量或浓度。可指导患者或护理人员保持以定期间隔自我施用或施用最终制剂,持续规定的时间段。

[0026] 在一实施方案中,向患者提供预封装于诸如注射器的合适递送装置中的 VLA-4 结合抗体的高度浓缩制剂。

[0027] 在另一方面中,本发明特征为一种方法,例如指导需要 VLA-4 结合抗体疗法的患者如何施用本文所述的制剂的方法。该方法包括(i)向患者提供至少一单位剂量的本文所述的 VLA-4 结合抗体的高度浓缩制剂;及(ii)指导患者以肌肉内或皮下方式自我施用该至少一单位剂量。另一方法(例如治疗方法)包括(i)向患者提供至少两单位剂量的 VLA-4 结合抗体的高度浓缩制剂;及(ii)指导患者以皮下或肌肉内方式自我施用该单位剂量,例如一次一剂量。

[0028] 在一实施方案中,患者具有炎性病症,诸如多发性硬化症。在其它实施方案中,患者具有例如哮喘(例如过敏性哮喘)、关节炎病症(例如,类风湿性关节炎、银屑病关节炎)、糖尿病(例如 I 型糖尿病)、纤维化病症(例如,肺纤维化、骨髓纤维化、肝硬化、系膜增生性肾小球肾炎、新月体性肾小球肾炎、糖尿病性肾病、肾间质性纤维病)或炎性肠病(例如, Crohn 病、溃疡性结肠炎)。

[0029] 另一方面,本发明特征为本文所述的 VLA-4 结合抗体的浓缩制剂的单位剂量,其中单位剂量为约 0.25mL 至约 1.5mL(例如,约 0.5mL、约 0.75mL 或约 1.0mL)。在一实施方案

中,单位剂量为约 100mg 至约 450mg (例如,约 150mg、约 160mg、约 180mg、约 200mg、约 250mg、约 300mg 或约 350mg)。

[0030] 在另一方面中,本发明特征为 VLA-4 结合抗体的含水制剂的单位剂量,其中向人类施用单位剂量将向人类递送每千克体重约 1.4mg 与约 3.0mg 之间的 VLA-4 结合抗体或其片段。

[0031] 在另一方面中,本发明特征为通过向患者施用适于 SC 或 IM 施用的制剂形式的含有 VLA-4 结合抗体的组合物来治疗患者的方法。在一实施方案中,患者具有炎性病症,诸如多发性硬化症、哮喘、类风湿性关节炎、糖尿病或 Crohn 病。在另一实施方案中,按照方案施用组合物。在另一实施方案中,方法还包括选择适于以该组合物治疗的患者。适于治疗的患者例如已显示指示疾病发作的体征或症状,诸如指示 MS 的体征或症状。在又一实施方案中,方法还包括向患者施用第二治疗剂,诸如溶血栓剂、神经保护剂、抗炎剂、类固醇、细胞因子或生长因子。

[0032] 在另一方面中,本发明特征为通过确定患者是否符合预先选定的标准,且如果患者符合预先选定的标准,则向患者核准、提供、指定或施用本文所述的 VLA-4 结合抗体制剂来评估患者的方法。在一实施方案中,预先选定的标准为患者未能对先前替代性治疗性治疗或方案(例如用于治疗 MS)作出充分反应。在另一实施方案中,预先选定的标准为不存在进行性多病灶白质脑病(PML)的任何体征或症状,或不存在 PML 的任何诊断。在另一实施方案中,标准如 2006 年 8 月 9 日提交的 USSN 60/836,530 (以引用的方式并入本文中)中所述,其描述药物分装(distribution)的方法及系统。

[0033] 在另一方面中,本发明特征为指导接受者施用那他珠单抗的高度浓缩制剂的方法。该方法包括指导接受者(例如,最终使用者、患者、医师、零售或批发药房、经销商,或在医院、疗养院诊所或 HMO 的药剂部门)应以皮下或肌肉内方式向患者施用药物。

[0034] 在另一方面中,提供分装本文所述的组合物的方法。组合物含有那他珠单抗的高度浓缩制剂且适于皮下或肌肉内或静脉内施用。该方法包括向接受者(例如,最终使用者、患者、医师、零售或批发药房、经销商或在医院、疗养院诊所或 HMO 的药剂部门)提供含有治疗患者至少 6、12、24 或 36 个月的药物的足够单位剂量的包装。

[0035] 在另一方面中,本发明特征为评估本文所述的含有高度浓缩量的 VLA-4 结合抗体的组合物的包装或一批包装的质量的方法(例如,测定其是否已过期)。该方法包括评估包装是否已过期。过期日期为自诸如制造、检定或包装的预先选定的事件起至少 6、12、24、36 或 48 个月,例如大于 24 或 36 个月。在一些实施方案中,由分析结果作出决定或采取步骤,例如,将包装中的抗体加以使用或丢弃、分类、选择、投放或保留、载运、移动至新位置、投放市场、出售或供给销售、自市场退出或不再供给销售,取决于产品是否已过期。

[0036] 在另一方面中,本发明特征为含有至少 2 单位剂量的含水组合物的包装,该组合物含有高度浓缩量的 VLA-4 结合抗体。在一实施方案中,所有单位剂量均含有相同量的抗体,且在其它实施方案中,存在两个或两个以上强度的单位剂量,或两种或两种以上不同制剂,其例如具有不同强度或释放特性。在一实施方案中,至少一个剂量含有约 100mg 至约 450mg 的 VLA-4 结合抗体,例如约 100mg、约 200mg、约 250mg、约 300mg、约 350mg 或约 400mg 的 VLA-4 结合抗体。

[0037] 在另一方面中,本发明包括指导接受者施用含有 VLA-4 结合抗体的含水制剂的方

法。该方法包括指导接受者（例如，最终使用者、患者、医师、零售或批发药房、经销商，或医院、疗养院诊所或 HMO 的药剂部门）应在过期日期之前向患者施用抗体。过期日期为自例如制造、检定或包装的预先选定的事件起至少 6、12、18、24、36 或 48 个月，例如大于 18、24 或 36 个月。在一实施方案中，接受者亦接受抗体供应，例如单位剂量供应。

[0038] 在另一方面中，本发明特征为本文所述的制剂在 PCT/US 2007/07557（公开为 WO/2008/021954）中所述的方法或系统的用途。实施方案包括分装本文所述的制剂、监测或跟踪本文所述的制剂对药房、输注中心或患者的提供、监测一或多个患者、选择患者，或汇编或报导关于本文所述的制剂的用途的数据的方法。PCT/US 2007/075577（公开为 WO/2008/021954）是以引用的方式并入本文中。

[0039] 在另一方面中，本发明特征为选择以本文所述的制剂治疗本文所述的病症（例如多发性硬化症）的患者的方法。该方法包括：

[0040] 选择或提供已通过静脉内递送例如那他珠单抗的 VLA-4 结合抗体来治疗的患者；
且

[0041] 向患者提供或施用本文所述的制剂，

[0042] 藉此治疗患者。

[0043] 在另一方面中，本发明特征为分析产物或过程（例如制造过程）的方法。该方法包括提供高度浓缩 VLA-4 结合抗体组合物的含水制剂，例如通过本文所述的过程制造的含水制剂，且通过评估溶液参数，诸如颜色（例如，无色至微黄，或无色至黄色）、透明度（例如，澄清至微乳光或澄清至乳光）或粘度（例如，当在环境温度下（诸如在 20℃ -30℃ 下，例如 25℃ 下）测量时在约 5cP 与 30cP 之间（例如，10cP、20cP））提供对制剂的评估。评估可包括评估一或多个溶液参数。任选地，确定溶液参数是否符合预先选定的标准，例如确定预先选定的标准是否存在，或是否存在于预先选定的范围内，藉此分析该过程。

[0044] 在一实施方案中，对过程的评估包括测量抗 VLA-4 抗体制剂的稳定性。可例如通过聚集体形成来测量抗体制剂的稳定性，该聚集体形成例如通过尺寸排阻高压液相层析（HPLC），通过如本文中所述的颜色、透明度或粘度来检定。若历经预设时间段且任选地在给定温度下检定参数变化小于约 10%、5%、3%、2%、1%、0.5%、0.05% 或 0.005% 或更小，则可确定制剂为稳定的，且因此可接受进一步加工或分装。在一实施方案中，高度浓缩液体抗 VLA-4 抗体制剂在室温下（例如，在约 18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃ 或 25℃ 下）稳定 1、2、3、4 或 5 天或更久。

[0045] 在一实施方案中，该方法还包括比较所测定的值与参考值以藉此分析制造过程。

[0046] 在一实施方案中，该方法还包括至少部分基于分析来维持制造过程。在一实施方案中，该方法还包括基于分析来改变制造过程。

[0047] 在另一实施方案中，该方法包括评估通过所选过程制得的高度浓缩 VLA-4 结合抗体的含水制剂的过程，例如制造过程，其包括基于本文所述的方法或分析作出关于过程的决定。在一实施方案中，该方法还包括至少部分基于方法或分析来维持或改变制造过程。因此，在另一实施方案中，进行评估的一方不实施本文所述的方法或分析而仅依赖于通过本文所述的方法或分析获得的结果。

[0048] 在另一实施方案中，该方法包括比较监测或控制批间偏差的方法中的两种或多种制品或将制品与参考标准作比较。

[0049] 在又一实施方案中,该方法可还包括作出决定,以至少部分基于该决定来例如分类、选择、接受或丢弃、发行或保留、加工为药品、载运、移动至不同位置、配制、贴标签、包装、投放市场、出售或供给销售制品。

[0050] 在另一方面中,本发明特征为储存、分装或使用本文所述的 VLA-4 结合抗体制剂例如那他珠单抗制剂的方法。该方法包括:

[0051] 在第一低温下将制剂储存第一时期,该低温例如低于 18°C,例如高于冰点但等于或低于 15°C、10°C 或 4°C;

[0052] 在第二较高温度下将制剂储存第二时期,该较高温度例如不冷藏或在室温下,例如在 18°C 与 25°C 之间,其中该第二时期不多于 24、48、72 或 96 小时,且其中在一些实施方案中,在向患者施用制剂或丢弃制剂后第二时期即结束。

[0053] 在另一方面中,本发明特征为储存、分装或使用本文所述的 VLA-4 结合抗体制剂例如那他珠单抗制剂的方法。该方法包括:

[0054] 在第一低温下储存制剂,该低温例如低于 18°C,例如高于冰点但等于或低于 15°C、10°C 或 4°C;

[0055] 向接受者,例如最终用户,例如患者或护理人员提供制剂;

[0056] 任选地,指导最终用户可将制剂储存在第二较高温度下,该较高温度例如不冷藏或在室温下,例如在 18°C 与 25°C 之间;且

[0057] 在接受者收到之后,在第二温度下将制剂储存至多 24、48、72 或 96 小时。

[0058] 在另一方面中,本发明特征为指导实体(例如药房、经销商、或最终用户,例如患者或护理人员)如何储存、分装或使用本文所述的 VLA-4 结合抗体制剂例如那他珠单抗制剂的方法。该方法包括:

[0059] 指导实体应将制剂储存在第一低温下,例如低于 18°C,例如高于冰点但等于或低于 15°C、10°C 或 4°C 第一时期,其中该第一时期延长至将制剂提供给最终用户或至在施用于患者之前 24、48、72 或 96 小时内;且

[0060] 指导实体可将制剂储存在第二较高温度下,该较高温度例如不冷藏或在室温下,例如在 18°C 与 25°C 之间第二时期,其中该第二时期不超过 24、48、72 或 96 小时,藉此指导实体。

[0061] 在另一方面中,本发明特征为储存、分装或使用本文所述的 VLA-4 结合抗体制剂例如那他珠单抗制剂的方法。该方法包括:

[0062] 在第一低温下储存制剂,该低温例如低于 18°C,例如高于冰点但等于或低于 15°C、10°C 或 4°C;且

[0063] 在第二较高温度下储存制剂,该较高温度例如不冷藏或在室温下,例如在 18°C 与 25°C 之间不多于 24、48、72 或 96 小时。

[0064] 在另一方面中,本发明特征为评估的方法,诸如,例如在质量控制或发行规格分析中评估高度浓缩 VLA-4 结合抗体的含水制剂的质量。该方法包括提供对抗体制剂的溶液参数的评估,所述参数诸如颜色(例如,无色至微黄,或无色至黄色)、透明度(例如,澄清至微乳光或澄清至乳光)或粘度(例如,当在环境温度下(诸如在 20°C -30°C 下,例如 25°C)测量时在约 5cP 与 30cP 之间)。评估可包括对以上参数中一或多个的评估。该方法亦任选地包括确定溶液参数是否符合预先选定的标准,例如预先选定的标准是否存在,或是否存

在于预先选定的范围内。若所观察到的溶液参数在预先选定的值范围内,或符合预先选定的标准规范,则制品被选择用来诸如包装、使用、出售、投放市场、丢弃等。

[0065] 在另一方面中,本发明特征为遵循管理要求,例如管理机构(例如 FDA)的批准要求的方法。该方法包括提供对抗体制剂的溶液参数的评估,诸如颜色(例如,无色至微黄,或无色至黄色)、透明度(例如,澄清至微乳光或澄清至乳光)或粘度(例如,当在环境温度下(诸如在 20℃ -30℃ 下)测量时在约 5cP 与 30cP 之间)。批准后要求可包括对以上参数中一或多个的测量。该方法任选地亦包括确定所观察到的溶液参数是否符合预先选定的标准或参数是否在预先选定的范围内;任选地记下分析的值或结果,或与该机构沟通,例如通过将值或结果传送至管理机构。

[0066] 在另一方面中,本发明特征为制造一批 VLA-4 结合抗体的含水制剂的方法,该批次具有预先选定的特性,例如满足发行规格、标签要求或药典(compendial)要求,例如本文所述的特性。该方法包括提供测试抗体制品;根据本文所述的方法来分析测试抗体制品;确定测试抗体制品是否满足预先选定的标准,例如与参考值例如本文中公开的一或多个参考值具有预先选定的关系,且选择测试抗体制品以制造一批产品。

[0067] 在另一方面中,本发明特征为多批 VLA-4 结合抗体的含水制剂,其中各批的一或多个溶液参数(例如,通过本文所述的方法测定的值或溶液参数)偏离预先选定的所需参考值或标准(例如本文所述的范围或标准)的变化小于预先选定的范围。在一些实施方案中,测定一或多批抗体制剂的一或多个参数且经由该测定结果来选择一批或多批。一些实施方案包括将测定结果与预先选定的值或标准(例如参考标准)作比较。其它实施方案包括例如基于值或参数的测定结果来调节待施用的批的剂量。

[0068] 在另一方面中,本发明特征为以下各项中一或多个的方法:向报告-接收实体提供报告,评估 VLA-4 结合抗体的含水制剂样本与参考标准(例如 FDA 要求)的同一性,自另一方寻求 VLA-4 结合抗体制品符合一些预先确定要求的指示,或对另一方递交关于 VLA-4 结合抗体制品的信息。示例性接收实体或其它方包括政府,例如美国联邦政府,例如政府机构,例如 FDA。该方法包括以下步骤中的一或多个(或全部):在第一国家(例如 US)制造和/或测试 VLA-4 结合抗体的含水制剂;将样本的至少一个小份送到第一国家之外,例如将其送到美国之外,至第二国家;制备或接收包括关于 VLA-4 结合抗体的制品结构的数据的报告,例如与本文所述的结构和/或链相关的数据,例如通过本文所述方法中的一或多个产生的数据;且向报告接受者实体提供报告。

[0069] 在一实施方案中,报告接收实体可确定数据是否符合预定要求或参考值,且任选地,例如 VLA-4 结合抗体的含水制剂的制造商、经销商或卖方是否收到来自报告接收实体的反应。在一实施方案中,收到报告接收者实体的批准后即将 VLA-4 结合抗体的制品加以选择、包装或投入市场中。

[0070] 在另一方面中,本发明特征为评估 VLA-4 结合抗体的含水制剂的方法。该方法包括接收关于 VLA-4 结合抗体的存在或含量的数据,例如其中通过本文所述方法中的一或多个来准备数据;提供包括该数据且任选地包括 VLA-4 结合抗体的批次标识符的记录;将该记录递交给决策者,例如政府机构,例如 FDA;任选地接收来自该决策者的通信;任选地基于来自决策者的通信决定是否发行或销售该批 VLA-4 结合抗体。在一实施方案中,该方法还包括发行样本。

- [0071] 示例性制剂包括以下：
- [0072] 1. 125-175mg/mL, 或 140-160mg/mL, 例如 150mg/mL 的那他珠单抗；
- [0073] 1-100mM、5-20mM 或 5-50mM, 例如 10mM 的磷酸钠缓冲液；
- [0074] 50-200mM、100-180mM 或 120-160mM, 例如 140mM 的氯化钠；
- [0075] 0.01-0.12%、0.02-0.08% 或 0.02-0.06%, 例如 0.04% (w/v) 的聚山梨酯 80, 及
- [0076] pH 值为 6.0 ± 1.0 , 例如 6.0 ± 0.5 ；
- [0077] 2. 125-175mg/mL 或 140-160mg/mL, 例如 150mg/mL 的那他珠单抗；
- [0078] 10mM 磷酸钠缓冲液；
- [0079] 140mM 氯化钠；
- [0080] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80 及
- [0081] pH 值为 6.0 ± 0.5 ；
- [0082] 3. 150mg/mL 那他珠单抗；
- [0083] 1-100mM、5-20mM 或 5-50mM, 例如 10mM 的磷酸钠缓冲液；
- [0084] 140mM 氯化钠；
- [0085] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80；及
- [0086] pH 值为 6.0 ± 0.5 ；
- [0087] 4. 150mg/mL 那他珠单抗；
- [0088] 10mM 磷酸钠缓冲液；
- [0089] 50-200mM、100-180mM 或 120-160mM, 例如 140mM 的氯化钠；
- [0090] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80 及
- [0091] pH 值为 6.0 ± 0.5 ；
- [0092] 5. 150mg/mL 那他珠单抗；
- [0093] 10mM 磷酸钠缓冲液；
- [0094] 140mM 氯化钠；
- [0095] 0.01-0.12%、0.02-0.08% 或 0.02-0.06%, 例如 0.04% (w/v) 的聚山梨酯 80, 及
- [0096] pH 值为 6.0 ± 0.5 ；
- [0097] 6. 150mg/mL 那他珠单抗；
- [0098] 10mM 磷酸钠缓冲液；
- [0099] 140mM 氯化钠；
- [0100] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80 及
- [0101] pH 值为 6.0 ± 1.0 , 例如 pH 值为 6.0 ± 0.5 ；
- [0102] 及
- [0103] 7. 150mg/mL 那他珠单抗；
- [0104] 10mM 磷酸钠缓冲液；
- [0105] 140mM 氯化钠；
- [0106] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80；及
- [0107] pH 值为 6.0 ± 0.5 。
- [0108] 在一些实施方案中, 以上制剂 1-7 中任一个可基本上不含氨基酸, 例如精氨酸或甘氨酸, 或甘油。

[0109] 本文中公开的方法及组合物可用于混合物中一或多种结构的存在、分布或量可具有或影响生物活性的地方。自结构活性远景来看该方法亦适用于评估或确保生物等效性。

[0110] 如本文中所用的“高度浓缩 VLA-4 结合抗体制剂”是指稳定的含水制剂,其含有在约 120mg/mL 至约 190mg/mL 之间(例如,约 120mg/mL、130mg/mL、140mg/mL、150mg/mL、160mg/mL、170mg/mL、180mg/mL、190mg/mL)的 VLA-4 结合抗体,诸如那他珠单抗。

[0111] “适于 SC 或 IM 施用”指向诸如人类的受治疗者施用组合物将具有治疗作用,诸如以改善受治疗者的一或多种症状。

[0112] 术语“治疗”是指以有效改善与病症相关的病状、症状或参数或预防病症进展至统计上显著的程度或至本领域技术人员可检测的程度的量、方式和/或模式来施用疗法。有效量、方式或模式可根据受治疗者而变化且可适合于受治疗者。

[0113] VLA-4 结合抗体的“稳定”制剂历经例如 12 个月、24 个月、36 个月或更长的延长时间段显示极少或无聚集、断裂、脱酰胺、氧化或生物活性变化中任一或多个的证据。举例而言,在一实施方案中,少于 10% 的组合物发生聚集、断裂或氧化。可通过已知方法,诸如目视检验颜色和/或透明度或通过 UV 光散射或尺寸排阻层析法来评估聚集、沉淀和/或变性。可通过检测且定量抗体的化学改变形式来评估蛋白质保持其生物活性的能力。尺寸修改(例如修剪),其可例如使用尺寸排阻层析法、SDS-PAGE 和/或基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱法(MALDI/TOF MS),或经蛋白质内切酶处理的抗体的肽图分析来评估。其它类型的化学变化包括电荷变化(例如,由于脱酰胺而发生),其可通过例如离子交换层析加以评估。如果在例如抗原结合检定测定中,抗体在给定时刻的生物活性在制备药物制剂时所显示的生物活性的约 10% 以内,则抗体在药物制剂中“保持其生物活性”。

[0114] “VLA-4 结合抗体”指与 VLA-4 整联蛋白结合,诸如与 VLA-4 整联蛋白的 $\alpha 4$ 亚基结合,且至少部分抑制 VLA-4 的活性,尤其 VLA-4 整联蛋白的结合活性或信号传输活性,例如转导 VLA-4 介导的信号的能力的抗体。举例而言,VLA-4 结合抗体可抑制 VLA-4 与 VLA-4 的同源配体(例如细胞表面蛋白质,诸如 VCAM-1)的结合,或与诸如纤连蛋白或骨桥蛋白的细胞外基质组分的结合。VLA-4 结合抗体可与 $\alpha 4$ 亚基或 $\beta 1$ 亚基或两者结合。在一实施方案中,抗体与 $\alpha 4$ 的 B1 表位结合。VLA-4 结合抗体可以小于约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或 10^{-10} M 的 K_d 与 VLA-4 结合。VLA-4 亦称为 $\alpha 4/\beta 1$ 及 CD29/CD49b。

[0115] 如本文中所用,术语“抗体”是指包括至少一个免疫球蛋白可变区,例如,提供免疫球蛋白可变域或免疫球蛋白可变域序列的氨基酸序列的蛋白质。举例而言,抗体可包括重(H)链可变区(本文中缩写为 VH)及轻(L)链可变区(本文中缩写为 VL)。在另一实例中,抗体包括两个重(H)链可变区及两个轻(L)链可变区。术语“抗体”涵盖抗体的抗原结合片段(例如,单链抗体、Fab 片段、 $F(ab')_2$ 片段、Fd 片段、Fv 片段及 dAb 片段)以及完整抗体,例如 IgA、IgG、IgE、IgD、IgM 型(以及其亚型)完整免疫球蛋白。免疫球蛋白的轻链可为 κ 或 λ 型。在一实施方案中,抗体经糖基化。抗体对于抗体依赖性细胞毒性和/或补体介导的细胞毒性而言可具有功能性,或对于这些活性中一或两者而言可不具有功能性。

[0116] VH 及 VL 区可进一步再分成称为“互补决定区”(“CDR”)的高变区,其间散置有称为“框架区”(FR)的更保守区域。已精确界定 FR 及 CDR 的范围(参见 Kabat, E. A., 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫关注的蛋白质的序列),第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH 公布第 91-3242 号;及

Chothia, C. 等人 (1987) *J. Mol. Biol.* **196**:901-917)。本文中使用 Kabat 定义。每个 VH 及 VL 通常由三个 CDR 及四个 FR 组成,其自氨基末端至羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0117] “免疫球蛋白域”指免疫球蛋白分子的可变域或恒定域的域。免疫球蛋白域通常含有两个由约七个 β 链形成的 β 片层,及保守的二硫键(例如参见 A. F. Williams 及 A. N. Barclay 1988 *Ann. Rev. Immunol.* **6**:381-405)。

[0118] 如本文中所用,“免疫球蛋白可变域序列”指可形成免疫球蛋白可变域的结构氨基酸序列。举例而言,该序列可包括天然存在的可变域的所有或部分氨基酸序列。举例而言,该序列可省略一个、两个或两个以上 N 端或 C 端氨基酸、内部氨基酸,可包括一或多个插入或额外末端氨基酸,或可包括其它变化。在一实施方案中,包括免疫球蛋白可变域序列的多肽可与另一免疫球蛋白可变域序列缔合以形成靶标结合结构(或“抗原结合位点”),例如与 VLA-4 相互作用的结构。

[0119] 抗体的 VH 或 VL 链可还包括所有或部分重链或轻链恒定区以藉此分别形成重或轻免疫球蛋白链。在一实施方案中,抗体为两个免疫球蛋白重链与两个免疫球蛋白轻链的四聚体。免疫球蛋白重链与免疫球蛋白轻链可由二硫键连接。重链恒定区通常包括三个恒定域,CH1、CH2 及 CH3。轻链恒定区通常包括 CL 域。重链及轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区通常介导抗体与包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)及经典补系统的第一成分(C1q)的宿主组织或因子的结合。

[0120] 抗体的一或多个区可为人类的、有效人类的或人源化的。举例而言,可变区中的一或多个可为人类的或有效人类的。举例而言,CDR 中的一或多个,例如 HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及 LCCDR3,可为人类的(HC,重链;LC,轻链)。轻链 CDR 中的每一个可为人类的。HC CDR3 可为人类的。框架区中的一或多个可为人类的,例如 HC 或 LC 的 FR1、FR2、FR3 及 FR4。在一个实施方案中,所有框架区均为人类的,例如来源于人类体细胞,例如产生免疫球蛋白的造血细胞,或非造血细胞。在一个实施方案中,人类序列例如由种系核酸编码的种系序列。恒定区中的一或多个可为人类的、有效人类的或人源化的。在另一个实施方案中,框架区的至少 70%、75%、80%、85%、90%、92%、95% 或 98%(例如 FR1、FR2 及 FR3 总体,或 FR1、FR2、FR3 及 FR4 总体)或全部抗体可均为人类的、有效人类的或人源化的。举例而言,FR1、FR2 及 FR3 总体可与人类种系区段所编码的人类序列至少 70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、98% 或 99% 一致。

[0121] “有效人类的”免疫球蛋白可变区为包括足够数目的人类框架氨基酸位置以使得免疫球蛋白可变区在正常人类中不引发免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。“有效人类的”抗体为包括足够数目的人类氨基酸位置以使得抗体在正常人类中不引发免疫原性反应的抗体。

[0122] “人源化的”免疫球蛋白可变区为经修饰以使得在人类中该修饰形式比非修饰形式引发较少免疫反应,例如经修饰以包括足够数目的人类框架氨基酸位置以使得免疫球蛋白可变区在正常人类中不引发免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。“人源化的”免疫球蛋白的描述包括例如美国专利第 6,407,213 号及美国专利第 5,693,762 号。在一些情况下,人源化的免疫球蛋白可在一或多个框架氨基酸位置包括非人类氨基酸。

[0123] 所有或部分抗体可由免疫球蛋白基因或其区段编码。示例性人类免疫球蛋白基因

包括 κ 、 λ 、 α (IgA1 及 IgA2)、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 及 μ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”(约 25Kd 或 214 个氨基酸)由 NH_2 -末端的可变区基因(约 110 个氨基酸)及 COOH -末端的 κ 或 λ 恒定区基因编码。全长免疫球蛋白“重链”(约 50Kd 或 446 个氨基酸)类似地由可变区基因(约 116 个氨基酸)及例如 γ 的其它上述恒定区基因中的一个(编码约 330 个氨基酸)编码。

[0124] 术语全长抗体的“抗原结合片段”指保留与所关注靶标(例如 VLA-4)特异性结合的能力的全长抗体的一或多个片段。涵盖于术语全长抗体的“抗原结合片段”中的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段,其为由 VL、VH、CL 及 CH1 域组成的单价片段;(ii) F(ab')_2 片段,其为由两个由铰链区的二硫化物桥连接的 Fab 片段的二价片段;(iii) 由 VH 及 CH1 域组成的 Fd 片段;(iv) 由抗体的单臂的 VL 及 VH 域组成的 Fv 片段;(v) 由 VH 域组成的 dAb 片段(Ward 等人,(1989)Nature 341:544-546);及 (vi) 保留功能性的孤立互补决定区(CDR)。另外,尽管 Fv 片段的两个域 VL 及 VH 是由独立基因编码,但其可使用重组法由合成连接体结合,该连接体使其能够制成为其中 VL 及 VH 区配对以形成称为单链 Fv(scFv)的单价分子的单一蛋白质链。例如参见 Bird 等人(1988)Science 242:423-426;及 Huston 等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。

[0125] 如本文中所用,“约”指在给定值的 0.1%至 5%以内(例如在给定值的上下 5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%之内)。当本文中提供量及其它指定值时,可容许偏差在药学上可接受的标准以内。

[0126] 本发明的实施方案提供某些优势。在一些情况下,难以制造适用于药物组合物的高浓度蛋白质(例如抗体)制剂。本文提供制备这些制剂的方法。含有高浓度蛋白质,例如抗 VLA-4 抗体的药物组合物可适用于历经较短时段的施用。高浓度制剂,例如抗 VLA-4 抗体的高浓度制剂亦可通过简化方法(例如皮下)施用。

[0127] 在附图及以下描述中阐述本发明的一或多个实施方案的细节。本发明的其它特征、目标及优势将通过说明书及附图和权利要求而明显。

附图说明

[0128] 图 1 展示在各种制剂中浓度为 150mg/mL 的那他珠单抗在搅拌前及搅拌后的可溶性聚集体的水平。HCN = 20mM 组氨酸、240mM 甘氨酸、0.04% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6。HOL = 20mM 组氨酸、240mM 甘油、0.04% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6。PCN = 20mM 磷酸盐、240mM 甘氨酸、0.02% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6。PST = 20mM 磷酸盐、140mM NaCl、0.02% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6。

[0129] 图 2 展示如图 1 所述在制剂中浓度为 150mg/mL 的那他珠单抗在搅拌前及搅拌后在溶液中的在 340nm 下的 UV 吸光度。

[0130] 图 3 展示对于那他珠单抗(150mg/mL)而言聚集与 HOL 制剂中各种含量的聚山梨酯 80 之间的关系(HOL = 20mM 组氨酸、240mM 甘油, pH 6;聚山梨酯 80 为实验的变量)。

[0131] 图 4 展示对于储存在 40°C 下在如图 1 中所述各种制剂中的那他珠单抗(150mg/mL)而言随时间的聚集百分比。

[0132] 图 5 展示对于在 2-8°C 之间储存于小瓶中、在如图 1 中所述各种制剂中的那他珠单抗(150mg/mL)而言随时间的聚集百分比。

[0133] 图 6 展示对于储存在 2-8℃ 之间及 40℃ 下、在如图 1 中所述的各种制剂中的那他珠单抗 (150mg/mL) 而言随时间的甲硫氨酸氧化百分比。

[0134] 图 7 展示对于那他珠单抗 (150mg/mL) 而言历经 6 个月作为自由基净化剂赋形剂函数的甲硫氨酸氧化百分比。

[0135] 图 8 展示对于在各种浓度下且在各种制剂中的那他珠单抗而言, 相对于时间 (8 周) 的断裂速率。

[0136] 发明详述

[0137] 高度浓缩 VLA-4 结合抗体的稳定制剂适用于皮下 (SC)、肌肉内 (IM) 或静脉内 (IV) 施用。为本发明特征的制剂含有约 120mg/mL 至约 190mg/mL 的 VLA-4 结合抗体, 诸如那他珠单抗。

[0138] 药物组合物

[0139] 将本文所述的组合物配制为药物组合物。可例如以在约 120mg/mL 与 190mg/mL 之间的浓度 (例如, 在约 120mg/mL 与约 180mg/mL 之间, 在约 140mg/mL 与约 160mg/mL 之间, 在约 135mg/mL 与约 165mg/mL 之间; 例如, 约 120mg/mL、130mg/mL、135mg/mL、140mg/mL、150mg/mL、160mg/mL、165mg/mL、170mg/mL、180mg/mL、190mg/mL) 在缓冲溶液中提供 VLA-4 结合抗体 (例如那他珠单抗)。在一实施方案中, 以大于 150mg/mL 且小于约 190mg/mL 的浓度在缓冲溶液中提供 VLA-4 结合抗体 (例如那他珠单抗)。在另一实施方案中, 以较高浓度 (例如, 170mg/mL 至 190mg/mL) 制备制剂, 且接着将其稀释回所需浓度 (例如, 135mg/mL 至 165mg/mL)。举例而言, 可以例如 175mg/mL、180mg/mL 或 185mg/mL 的抗体浓度制备制剂, 且接着将其稀释回施用所需的浓度, 例如 140mg/mL、145mg/mL、150mg/mL、155mg/mL 或 160mg/mL。可将组合物储存在 2-8℃ 下 (例如, 4℃、5℃、6℃、7℃)。

[0140] 在一实施方案中, 可将 VLA-4 结合抗体用诸如 160mM L-精氨酸盐酸盐 ($\pm 10\%$)、磷酸盐缓冲液 (例如, 七水合磷酸氢二钠及磷酸二氢钠) 及聚山梨酯 80 的赋形剂物质配制, 其中总钠含量不超过 60mM。在另一实施方案中, 可将 VLA-4 结合抗体用 275mM 甘油 ($\pm 10\%$)、磷酸盐缓冲液 (例如, 七水合磷酸氢二钠及磷酸二氢钠或其它磷酸盐) 及聚山梨酯 80 配制, 且基本不含氯化钠。在另一实施方案中, 可将 VLA-4 结合抗体用 140mM 氯化钠 ($\pm 10\%$)、磷酸盐缓冲液及聚山梨酯 80 配制。下文例如在实施例 8、9、10、11 及 12 中提供包括磷酸盐缓冲液的示例性制剂。

[0141] 在一实施方案中, 可将 VLA-4 结合抗体用诸如 240mM 甘油 ($\pm 10\%$)、组氨酸缓冲液、聚山梨酯 80 及任选地 L-甲硫氨酸的赋形剂物质配制。下文例如在实施例 13 及 14 中提供包括组氨酸缓冲液的示例性制剂。

[0142] 磷酸盐缓冲液是本领域已知的且包括例如调节至适当 pH 值的磷酸氢二钠 (无水)、七水合磷酸氢二钠、二水合磷酸氢二钠、无水磷酸二氢钠、单水合磷酸二氢钠、二水合磷酸二氢钠、无水磷酸三钠或十二水合磷酸三钠的水溶液。磷酸盐缓冲液亦包括例如调节至适当 pH 值的磷酸二氢钾、无水磷酸氢二钾或磷酸三钾。

[0143] 组氨酸缓冲液是本领域已知的且包括例如以盐酸或氢氧化钠或本领域已知的其它酸或碱调节至适当 pH 值的 D-组氨酸、单水合一氯化 D-组氨酸、DL-组氨酸、单水合一氯化 DL-组氨酸、L-组氨酸或单水合一氯化 L-组氨酸的水溶液。

[0144] 药物组合物通常包括药学上可接受的载体。如本文中所示, “药学上可接受的载

体”包括任何及所有溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂，及生理上相容的类似药剂。

[0145] “药学上可接受的盐”指保留抗体的所需生物活性且不赋予任何不希望的毒理作用的盐（例如参见 Berge, S. M., 等人 (1977) J. Pharm. Sci. 66 :1-19）。这些盐的实例包括酸加成盐及碱加成盐。酸加成盐包括衍生自诸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸及类似酸的无毒无机酸，以及衍生自诸如脂族单羧酸及二羧酸、苯基取代烷酸、羟基烷酸、芳族酸、脂族及芳族磺酸、游离氨基酸及类似酸的无毒有机酸的盐。碱加成盐包括衍生自诸如钠、钾、镁、钙及类似金属的碱土金属，以及衍生自诸如 N, N' - 二苄基乙二胺、N- 甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因及类似有机胺的无毒有机胺的盐。

[0146] 通常将生理上相容的药剂，诸如游离氨基酸、游离氨基酸的盐酸盐、钠盐或钾盐用作药物制剂中的赋形剂以促进抗体稳定性。本文中的制剂可包括添加剂，诸如甘油、甘露糖醇、山梨糖醇及其它多元醇，以及糖（例如蔗糖）以促进稳定性。

[0147] 为本文特征的制剂可包括药学上可接受的赋形剂，诸如表面活性剂，例如聚山梨酯 80、单硬脂酸甘油酯、硬脂酸聚氧酯 (polyoxyl stearate)、聚桂醇 (lauromacrogol) 或脱水山梨糖醇油酸酯 (sorbitan oleate)。在一实施方案中，为本文特征的制剂包括约 0.01% (w/v) 至约 0.1% (w/v) 聚山梨酯 80，例如约 0.2% 或 0.04% 聚山梨酯 80。

[0148] 含有高度浓缩 VLA-4 结合抗体的药物组合物呈液体溶液（例如，可注射及可输注溶液）的形式。这些组合物可通过胃肠外模式（例如，皮下、腹膜内或肌肉内注射）施用。如本文中所用的短语“胃肠外施用”及“胃肠外地施用”指通常通过注射的不同于肠内及局部施用的施用模式，且包括皮下或肌肉内施用以及静脉内、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、硬膜外及胸骨内注射及输注。在一实施方案中，皮下施用本文所述的制剂。

[0149] 药物组合物无菌且在制造及储存条件下稳定。亦可测试药物组合物以确保其符合施用的管理及行业标准。

[0150] 可将含有高度浓缩量的 VLA-4 结合抗体的药物组合物配制为溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适于高抗体浓度的有序结构。可通过将所需量的本文所述的药剂并入具有上文列举的成份中的一个或组合的适当溶剂中，视需要接着过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。一般通过将本文所述的药剂并入含有基本分散介质及来自上文列举的那些所需其它成份的无菌媒介物中来制备分散液。溶液的适当流动性可例如通过使用诸如卵磷脂的涂料、在分散液的情况下通过保持所需粒度及通过使用表面活性剂来保持。可通过使组合物包括延迟吸收的药剂（例如，单硬脂酸盐及明胶）来达成可注射组合物的延长吸收。

[0151] 在一些实施方案中，表征描述制剂的参数，例如可出现于产品标签上的参数。这些参数包括例如颜色（通常无色至微黄色，或无色至黄色）、透明度（通常澄清至微乳光，或澄清至乳光）及粘度（当在环境温度（诸如在 20℃ 至 30℃ 下）下测量时，通常在约 5cP 与 30cP 之间）。这些参数可通过是本领域已知的方法测量。举例而言，可使用市售乳光标准（例如可获自 HunterLabAssociates, Inc. (Reston, VA)）来测量透明度。

[0152] 在一些实施方案中，检定抗体制剂的稳定性。示例性方法包括例如聚集研究、氧化研究、断裂研究、唾液酸化研究、等电点研究、半抗体研究、重链及轻链同位 (parity) 研究及分析二级结构（例如通过圆二色性）、热变性（例如通过差示扫描热量测定的圆二色

性)、色氨酸环境(例如通过荧光)、IgG 折叠(例如通过远紫外线圆二色性)及芳族残基环境(例如通过 UV-Vis 分光光度测定法)。

[0153] 制造抗体制剂的方法

[0154] 可如经修改以适应高浓度抗体(例如,约 75mg/mL 至约 190mg/mL、100mg/mL 至约 180mg/mL、约 120mg/mL 至约 170mg/mL、135mg/mL 至约 165mg/mL 的浓度)的美国公开申请案 2005/0053598 中所述来制造含有 VLA-4 结合抗体制剂的制剂。过程可如本领域技术人员所已知加以改变,但一般将遵照诸如以下的程序。自含有制造所关注的抗体或蛋白质的细胞的工作细胞库获得安瓿。制备接种物。必要时以额外饲料培养或发酵接种物的细胞。通过离心和/或过滤来收集/澄清细胞。举例而言,这可通过例如螺旋卷式过滤将细胞浓缩 10 倍来执行。诸如经由 0.2 μ m 过滤器的中度过滤之后例如诸如通过蛋白 A Sepharose Fast Flow®进行亲和层析,且接着反向洗脱。含抗体的组合物接着在低 pH 值下,诸如在 pH 3.6-3.7 下接受处理。混合物接着接受病毒过滤,随后进行浓缩/透析过滤步骤。通过例如阴离子交换层析法,诸如通过 DEAE Sepharose Fast Flow®来进一步纯化组合物。此步骤可进行多次。自此点,接着将组合物进一步浓缩且接着纯化,例如通过凝胶过滤层析法,诸如经由 Sephacryl S300 HR®系统。如果需要,则可进一步浓缩含抗体的组合物。通过添加缓冲液及聚山梨酯,且经由超滤过程再浓缩抗体来制得最终制剂。所得抗体制剂可经质量控制测试且发布质量保证(QA)。可根据下文表 1 中所例示的任何方法来制造抗体制剂。举例而言,含有诸如那他珠单抗的 VLA-4 结合抗体的制剂可通过以下过程来制造。如本领域已知,将诸如 5,000 至 20,000 升(例如,5,000 ;10,000 ;15,000 ;20,000 升)的大批量细胞培养物接种、培养、进料、收集及澄清。例如通过层析、病毒灭活及病毒过滤来纯化经澄清的材料。超滤/透析过滤(UF/DF)经澄清的材料得到磷酸盐方法中间体。可将磷酸盐方法中间体储存在 2-8°C 下例如用于未来加工,诸如通过进一步浓缩蛋白质的方法加工。为制造最终制剂,将聚山梨酯及缓冲液(如本文中所述)添加至磷酸盐方法中间体中以达到最终所需抗体浓度。在一替代方案中,通过将磷酸盐方法中间体反稀释至缓冲液中达到最终所需浓度(例如,诸如 20mg/mL 的低浓度)来产生最终制剂。通常在最终稀释步骤期间添加聚山梨酯。

[0155] 在一实施方案中,如上所述在组氨酸制剂中制造 VLA-4 结合抗体制剂,但使磷酸盐方法中间体经历至少一个第二 UF/DF 过程,及任选地至少一个额外 UF 过程,至如本文中所述的组氨酸制剂缓冲液中达到最终所需浓度,诸如在约 75mg/mL 与 190mg/mL 之间,例如约 75mg/mL 至约 190mg/mL,例如 75mg/mL、100mg/mL、125mg/mL、135mg/mL、150mg/mL、165mg/mL、180mg/mL、190mg/mL。在一替代方案中,将组氨酸缓冲液中的抗体制剂调节至大于所需浓度的最终浓度。接着通过反稀释至组氨酸制剂缓冲液中达到所需蛋白质浓度来产生最终制剂。通常在最终稀释步骤期间添加聚山梨酯。

[0156] 在另一实施方案中,如上所述在磷酸盐制剂中制造抗体制剂,除了使磷酸盐方法中间体经历至少一个第二 UF/DF 过程,及任选地至少一个额外 UF 过程,至如本文中所述的磷酸盐制剂缓冲液中达到最终所需浓度,诸如在约 75mg/mL 与 190mg/mL 之间,例如约 75mg/mL 至约 190mg/mL,例如 75mg/mL、100mg/mL、125mg/mL、135mg/mL、150mg/mL、165mg/mL、180mg/mL、190mg/mL。在一替代方案中,将磷酸盐缓冲液中的抗体制剂调节至大于所需浓度的最终浓度,且通过反稀释至磷酸盐缓冲液中达到所需浓度来产生最终制剂。通常在

最终稀释步骤期间添加聚山梨酯。

[0157] 在另一实施方案中,如上所述在磷酸盐制剂中制造 VLA-4 结合抗体制剂,但遵照用于磷酸盐配制的商业 UF/DF 方法,且添加聚山梨酯以制造所需最终浓度的 VLA-4 结合抗体制剂,该所需最终浓度诸如在约 75mg/mL 与 190mg/mL 之间,例如约 75mg/mL 至约 190mg/mL,例如 75mg/mL、100mg/mL、125mg/mL、135mg/mL、150mg/mL、165mg/mL、180mg/mL、190mg/mL。在一替代方案中,将磷酸盐缓冲液中的抗体制剂调节至大于所需浓度的最终浓度,且接着通过反稀释至磷酸盐制剂缓冲液中达到所需蛋白质浓度来产生最终制剂。通常在最终稀释过程期间添加聚山梨酯。

[0158] 表 1. 制造抗体制剂的方法

[0159]

IV 配制方法	高浓度临床方法 (组氨酸制剂)	高浓度临床方法 (磷酸盐制剂)	高浓度商业 磷酸盐方法
15,000L 细胞培养物	15,000L 细胞培养物	15,000L 细胞培养物	15,000L 细胞培养物
↓	↓	↓	↓
收集及澄清	收集及澄清	收集及澄清	收集及澄清
↓	↓	↓	↓
纯化(层析、病毒灭活及病毒过滤)	纯化(层析、病毒灭活及病毒过滤)	纯化(层析、病毒灭活及病毒过滤)	纯化(层析、病毒灭活及病毒过滤)
↓	↓	↓	↓
UF/DF 成为磷酸盐方法 中间体	UF/DF#1 成为磷酸盐方法 中间体。若需要,则 储存在 2-8°C 下。	UF/DF#1 成磷酸盐方法 中间体。若需要,则储 存在 2-8°C 下。	用于 150mg/mL 磷酸 盐制剂的商业 UF/DF 方法
N/A	UF/DF#2 且 UF#3 成 150mg/mL 组氨酸缓冲 液	UF/DF#2 且 UF#3 成 150mg/mL 磷酸盐制剂 缓冲液	N/A
最终制剂(聚山梨酯添加)及填充药物物质	最终制剂(聚山梨酯添加)及填充药物物质	最终制剂(聚山梨酯添加)及填充药物物质	最终制剂(聚山梨酯添加)及填充药物物质

[0160]

[0161] 表 1 的 UF/DF 方法(例如,UF/DF#1、UF/DF#2)通常为使用例如平板或螺旋卷式超滤盒(例如具有 10kD 或 30kD 的孔尺寸)以浓缩且透析过滤抗体的切向流动方法。这些方法适于将产物浓缩至 0g/L 至 100g/L,例如 30g/L、50g/L、80g/L。表 1 的 UF 方法(例如

UF#3) 通常使用开放通道平板盒,其适于将产物浓缩至例如 0g/L 至 300g/L 或 300g/L 以上,诸如至 150g/L、200g/L、210g/L、220g/L、230g/L 或 240g/L。

[0162] 表 1 的商业 UF/DF 方法通常使用第一 UF/DF 操作以将产物透析过滤为制剂缓冲液且将产物浓缩至约 5g/L 至 40g/L(例如,约 10g/L、约 20g/L 约 30g/L)。通常进行第二 UF 操作以将产物进一步浓缩为约 135g/L 至约 185g/L(例如,约 140g/L、150g/L、165g/L)。

[0163] 可将本文所述的任何 VLA-4 结合抗体制剂封装于例如美国公开申请案 2005/0053598 中所述的无菌小瓶中,该申请案以引用的方式并入本文中。举例而言,可将制剂封装于例如 3.0mL、5.0mL 或 20mL 填充小瓶中。将经填充药品冷藏储存在约 2-8℃ 下。

[0164] 在一实施方案中,将最终制剂以液体形式封装于具有 1mL 可抽出最小体积的 3.0mL 填充小瓶中。举例而言,填充小瓶可包括约 1.1mL 至约 1.5mL(例如,约 1.1mL、约 1.2mL、约 1.3mL、约 1.4mL) 的抗体制剂。在另一实施方案中,以使得在使用时将 1mL 溶液注入患者且该 1mL 溶液递送所需量的抗体(例如,135mg 至 165mg 那他珠单抗,例如 150mg 那他珠单抗)的量,将该抗体制剂封装于预填充注射器中。

[0165] 那他珠单抗及其它 VLA-4 结合抗体

[0166] 适于本文所述的高度浓缩 VLA-4 结合抗体制剂的抗体包括那他珠单抗,其为 $\alpha 4$ 整联蛋白结合抗体。那他珠单抗(USAN 名称)具有抗体代号 AN100226 且亦称为“TYSABRI™”。在任何体内修饰(例如,氨基酸的修剪)之前那他珠单抗的轻链及重链的氨基酸序列展示于表 1-1 及表 1-2 中。

[0167] 表 1-1 :那他珠单抗轻链的序列 (SEQ ID NO :1)

[0168]	10	20	30	40	50
[0169]	1 DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCKTSQDIN	KYMAWYQQTP	
	GKAPRLLIHY				
[0170]	51 TSALQPGIPS	RFSGSGSGRD	YTFTISSLQP	EDIATYYCLQ	
	YDNLWTFGQG				
[0171]	101 TKVEIKRTVA	APSVFIFPPS	DEQLKSGTAS	VVCLLNNFYP	
	REAKVQWKVD				
[0172]	151 NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	TYSLSSTLTL	SKADYEKHKV	
	YACEVTHQGL				
[0173]	201 SSPVTKSFNR	GEC			

[0174] 表 1-2 :那他珠单抗重链的序列 (SEQ ID NO :2)

[0175]	10	20	30	40	50
[0176]	Q ¹ VQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGQRLEWMGR
[0177]	IDPANGYTKY	DPKFQGRVTI	TADTSASTAY	MELSSLRSED	TAVYYCAREG
[0178]	YYGNYGVYAM	DYWGQGT	VSSASTKGPS	VFPLAPCSRS	TSESTAALGC
[0179]	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL	QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG
[0180]	TKTYTCNV	KPSNTKVDKR	VESKYGPPCP	SCPAPEFLGG	PSVFLFPPKP
[0181]	KDTLMISRTP	EVT	QEDPEVQFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQFN
[0182]	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKG	LPSSIEKTIS	KAKGQPREPQ
[0183]	VYTLPPSQEE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV

[0184] LDS DGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSL GK²

[0185] ¹ 谷氨酰胺环化为焦谷氨酸

[0186] ² 赖氨酸在翻译后去除

[0187] 那他珠单抗抑制白细胞自血液迁移至中枢神经系统。那他珠单抗与活化 T- 细胞及其它单核白细胞表面上的 VLA-4 (亦称为 $\alpha 4 \beta 1$) 结合。其可破坏 T- 细胞与内皮细胞之间的黏着, 且因此防止单核白细胞穿越内皮且迁移至实质中。因此, 亦可降低促炎性细胞因子的含量。

[0188] 那他珠单抗可减少具有复发缓解型多发性硬化症及复发继发进行性多发性硬化症的患者的脑病灶及临床复发的数目。

[0189] 例如在美国专利第 5, 840, 299 号中描述那他珠单抗及相关 VLA-4 结合抗体。单克隆抗体 21.6 及 HP1/2 为结合 VLA-4 的示例性鼠单克隆抗体。那他珠单抗为鼠单克隆抗体 21.6 的人源化形式 (例如参见美国专利第 5, 840, 299 号)。亦已描述 HP1/2 的人源化形式 (例如参见美国专利第 6, 602, 503 号)。例如在美国专利第 6, 602, 503 号; Sanchez-Madrid 等人, 1986 Eur. J. Immunol., 16:1343-1349; Hemler 等人, 1987 J. Biol. Chem. 2:11478-11485; Issekutz 及 Wykretowicz, 1991, J. Immunol., 147:109 (TA-2mab); Pulido 等人, 1991 J. Biol. Chem., 266:10241-10245; 及美国专利第 5, 888, 507 号中描述若干其它 VLA-4 结合单克隆抗体, 诸如 HP2/1、HP2/4、L25 及 P4C2。

[0190] 一些 VLA-4 结合抗体识别参与与同源配体 (例如 VCAM-1 或纤连蛋白) 结合的 $\alpha 4$ 亚基的表位。许多这些抗体抑制 VLA-4 与同源配体 (例如, VCAM-1 及纤连蛋白) 的结合。

[0191] 一些适用 VLA-4 结合抗体可与例如淋巴细胞的细胞上的 VLA-4 相互作用, 但不引起细胞聚集。然而, 已观察到其它 VLA-4 结合抗体引起此聚集。HP1/2 不引起细胞聚集。HP1/2 单克隆抗体 (Sanchez-Madrid 等人, 1986) 具有极高效价, 阻断 VLA-4 与 VCAM1 及纤连蛋白两者的相互作用, 且对 VLA-4 上的表位 B 具有特异性。此抗体及其它 B 表位特异性抗体 (诸如 B1 或 B2 表位结合抗体; Pulido 等人, 1991, 前述) 代表一类可用于本文所述的制剂及方法中的 VLA-4 结合抗体。

[0192] 一示例性 VLA-4 结合抗体具有一或多个 CDR, 例如本文中所公开的特定抗体的所有三个 HC CDR 和 / 或所有三个 LC CDR, 或总言之与此抗体 (例如那他珠单抗) 至少 80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 一致的 CDR。在一实施方案中, H1 及 H2 高变环具有与本文所述的抗体的结构相同的正则结构。在一实施方案中, L1 及 L2 高变环具有与本文所述抗体的结构相同的正则结构。

[0193] 在一实施方案中, HC 和 / 或 LC 可变域序列的氨基酸序列与本文所述的抗体 (例如那他珠单抗) 的 HC 和 / 或 LC 可变域的氨基酸序列至少 70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或 100% 一致。HC 和 / 或 LC 可变域序列的氨基酸序列可与本文所述的抗体 (例如那他珠单抗) 的相应序列拥有至少一个氨基酸但不多于十个、八个、六个、五个、四个、三个或两个氨基酸的差异。举例而言, 差异可主要或完全在框架区中。

[0194] HC 及 LC 可变域序列的氨基酸序列可由在高严格性条件下与本文所述的核酸序列杂交的核酸序列或编码本文所述的可变域或氨基酸序列的核酸序列编码。在一实施方案中, HC 和 / 或 LC 可变域的一或多个框架区 (例如, FR1、FR2、FR3 和 / 或 FR4) 的氨基酸序列与本文所述的抗体的 HC 及 LC 可变域的相应框架区至少 70%、80%、85%、90%、92%、

95%、97%、98%、99%或100%一致。在一实施方案中，一或多个重链或轻链框架区（例如，HCFR1、FR2及FR3）与来自人类种系抗体的相应框架区的序列至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或100%一致。

[0195] 如下进行两个序列之间“同源性”或“序列同一性”（该术语本文中可互换使用）的计算。出于最佳比较目的将序列对准（例如，可将缺口（gap）引入第一及第二氨基酸或核苷酸序列中的一或两者中以达到最佳对准且出于比较目的可忽视非同源序列）。使用GCG软件包中的GAP程序将最佳对准确定为最佳得分，该GCG软件包具有Blossum 62计分矩阵，其中缺口罚分为12、缺口延伸罚分为4且移码缺口罚分为5。接着比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则该分子在该位置处一致（如本文中所用，氨基酸或核酸“同一性”等效于氨基酸或核酸“同源性”）。两个序列之间的同一性百分比为序列共有的一致位置的数目的函数。

[0196] 如本文中所用，术语“在高严格性条件下杂交”描述杂交及洗涤的条件。关于执行杂交反应的指南可见于Current Protocols in Molecular Biology（分子生物学最新方案），John Wiley&Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6中，其以引用的方式并入本文中。在该参考文献中描述水性及非水性方法且可使用任一个。高严格性杂交条件包括在6X SSC中在约45℃下杂交，接着在0. 2X SSC、0. 1% SDS中在65℃下洗涤一或多次，或基本类似的条件。

[0197] 施用

[0198] 可通过包括皮下、肌肉内及静脉内施用的多种方法向例如人类受治疗者的受治疗者施用本文所述的高度浓缩VLA-4结合抗体制剂。施用通常通过皮下或肌肉内注射进行。

[0199] 可以固定剂量形式或以mg/kg剂量施用制剂。施用通常呈固定剂量形式。举例而言，以每4周（例如每月）75mg与500mg之间（例如，100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg），或每两周50mg与250mg之间（例如，75mg、100mg、150mg、200mg），或每周一次25mg与150mg之间（例如，50mg、75mg、100mg、125mg）的固定单位剂量施用制剂。亦可以大丸剂形式以在1mg/kg与8mg/kg之间（例如，约6. 0、4. 0、3. 0、2. 0、1. 0mg/kg）的剂量施用制剂。通常对于每四周或一月一次施用而言，修改剂量范围包括小于每受治疗者500、400、300、250、200、150或100mg的剂量。举例而言，VLA-4结合抗体可每三至五周，例如每四周或每月施用。

[0200] 给药方案可经调节以提供所需反应，例如治疗反应。亦可选择剂量以减少或避免产生针对VLA-4结合抗体的抗体，以达到 $\alpha 4$ 亚基的大于40%、50%、70%、75%或80%饱和度，以达到 $\alpha 4$ 亚基的小于80%、70%、60%、50%或40%饱和度，或以预防循环白细胞含量增大。

[0201] 在某些实施方案中，活性剂可用将保护抗体避免快速释放的载体制备，诸如控释制剂，其包括植入物，及微囊化递送系统。可使用可生物降解、生物相容性聚合物，诸如乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。制备这些制剂的许多方法已获得专利或普遍已知。例如参见Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems（缓释和控释药物递送系统），J. R. Robinson 编，Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0202] 给药方案可经调节以提供所需反应,例如治疗反应。“治疗反应”为与病症相关的病状、症状或参数的改善,至统计学上显著的程度或至本领域技术人员可检测的程度。

[0203] 如本文中所用的单位剂型或“固定剂量”指适于以单次剂量形式用于待治疗受治疗者的物理上离散的单位;各单位含有经计算以产生所需治疗作用的预定量的活性抗体,其与所需药物载体缔合且任选地与其它药剂缔合。

[0204] 药物组合物可包括“治疗有效量”的本文所述的 VLA-4 结合抗体,例如那他珠单抗。可基于所施用药剂的作用或药剂与第二药剂的组合作用(若使用一种以上药剂)来确定这些有效量。治疗有效量的药剂亦可根据以下因素而变化:诸如个体的疾病病况、年龄、性别及体重,及抗体在个体中引发所需反应的能力,例如改善至少一个病症参数,例如多发性硬化症参数,或改善例如多发性硬化症的病症的至少一种症状。治疗有效量亦为治疗有利作用超过组合物的任何毒性或不利作用的量。

[0205] 装置及试剂盒

[0206] 可用医疗装置来施用具有高浓度 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)的制剂。该装置可经设计具有诸如便携性、室温储存且易于使用的特征,以便其可在紧急情况中例如由未经训练的受治疗者或户外急救人员使用,移除至医疗设施及其它医疗设备。装置可包括例如一或多个用于储存包括 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)的药物制品的外壳,且可经配置以递送药剂的一或多个单位剂量。

[0207] 举例而言,可用经皮递送装置来施用药物组合物,该递送装置诸如注射器,包括皮下或多室注射器。在一实施方案中,该装置为具有随附或一体式针头的预填充注射器。在其它实施方案中,该装置为不具有随附针头的预填充注射器。针头可与预填充注射器一起封装。在一实施方案中,装置为自动注射装置,例如自动注射注射器。在另一实施方案中,注射装置为笔式注射器(pen-injector)。在又一实施方案中,注射器为桩式(staked)针头注射器、路厄旋锁注射器(luer lock syringe)或路厄滑锁注射器(luer slipsyringe)。其它合适递送装置包括支架、导管、微针头及可植入控释装置。可用有或无内嵌过滤器的标准 IV 设备包括例如 IV 管静脉内施用组合物。在某些实施方案中,装置将为适用于 SC 或 IM 施用的注射器。

[0208] 可用医疗装置施用药物组合物。举例而言,可用无针头皮下注射装置来施用药物组合物,该装置诸如美国专利第 5,399,163 号、第 5,383,851 号、第 5,312,335 号、第 5,064,413 号、第 4,941,880 号、第 4,790,824 号或第 4,596,556 号中所公开的装置。熟知植入物及模块的实例包括:美国专利第 4,487,603 号,其公开用于以受控速率分配药物的可植入微输注泵;美国专利第 4,486,194 号,其公开用于经由皮肤施用药物的治疗装置;美国专利第 4,447,233 号,其公开用于以精确输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利第 4,447,224 号,其公开用于连续药物递送的可变流量可植入输注装置;美国专利第 4,439,196 号,其公开具有多室隔室的渗透药物递送系统;及美国专利第 4,475,196 号,其公开渗透药物递送系统。治疗组合物亦可呈用于皮下或肌肉内施用的可生物降解或不可生物降解缓释制剂的形式。例如参见美国专利第 3,773,919 号及第 4,767,628 号及 PCT 申请案第 WO 94/15587 号。使用可植入或外部泵亦可达连续施用。施用亦可间歇地进行,例如单次每日注射,或以低剂量连续进行,例如缓释制剂。可将递送装置修改以最佳适用于施用 VLA-4 结合抗体。举例而言,可使注射器硅化至对于储存及递送抗 VLA-4 抗体而言为最

佳的程度。当然,亦已知许多其它这些植入物、递送系统及模块。

[0209] 本发明亦特征为用于施用第一及第二药剂的装置。该装置可包括例如一或多个用于储存药物制品的外壳,且可经配置以递送单位剂量的第一及第二药剂。第一及第二药剂可储存于相同或独立隔室中。举例而言,装置可在施用之前组合药剂。亦可能使用不同装置来施用第一及第二药剂。

[0210] 可将 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)于试剂盒中提供。在一实施方案中,试剂盒包括(a)容纳包括高浓度 VLA-4 结合抗体的组合物的容器、任选地(b)容纳包括第二药剂的组合物的容器及任选地(c)信息材料。信息材料可为描述性、指导性、销售性或其它关于本文所述的方法和/或对于治疗益处而言的药剂用途的材料。在一实施方案中,试剂盒亦包括第二药剂。举例而言,试剂盒包括容纳包括 VLA-4 结合抗体的组合物的第一容器及包括第二药剂的第二容器。在一实施方案中,试剂盒包括一或多个以本文所述的高浓度液体抗体制剂预填充的单次使用注射器。

[0211] 试剂盒的信息材料并不限于其形式。在一实施方案中,信息材料可包括关于抗体制造、浓度、过期日期、批次或制造地点信息等诸如此类的信息。在一实施方案中,信息材料关于例如以合适剂量、剂型或施用模式(例如,本文所述的施用剂量、剂型或模式)施用 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗),以治疗具有炎性疾病(例如 MS)或处于经历与炎性疾病相关的事件的风险中的受治疗者的方法。可以多种格式提供信息,包括印刷文本、计算机可读材料、录像或录音,或提供大量材料的链接或地址的信息。

[0212] 除药剂之外,试剂盒中的组合物可包括其它成份,诸如溶剂或缓冲剂、稳定剂或防腐剂。可以任何形式,例如液体、干燥或冻干形式,及以基本上纯和/或无菌形式来提供药剂。当以液体溶液形式提供药剂时,液体溶液例如水溶液。当以干燥形式提供药剂时,重构一般通过添加合适溶剂进行。任选地可将例如无菌水或缓冲液的溶剂提供于试剂盒中。

[0213] 试剂盒可包括一或多个用于含有药剂的组合物的容器。在一些实施方案中,试剂盒含有用于组合物及信息材料的独立容器、间隔物或隔室。举例而言,组合物可容纳于瓶、小瓶或注射器中,且信息材料可容纳于塑料套筒或封包中。在其它实施方案中,在单一未间隔容器内容纳有试剂盒的独立组件。举例而言,组合物容纳在随附有标签形式的信息材料的瓶、小瓶或注射器中。在一些实施方案中,试剂盒包括多个(例如一包)个体容器,其各容纳药剂的一或多个单位剂型(例如,本文所述的剂型)。容器可包括组合单位剂量,例如包括例如呈所需比率的 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)及第二药剂的单位。举例而言,试剂盒包括多个注射器、安瓿、箔封包、发泡封包或医疗装置,例如其各容纳单次组合单位剂量。试剂盒的容器可为气密、防水(例如,对于水分变化或蒸发为不透的)和/或不透光容器。

[0214] 试剂盒任选地包括适于施用组合物的装置,例如注射器或其它合适递送装置。装置可经提供为预负载有药剂中的一或两者或可为空的但适于负载。

[0215] 多发性硬化症

[0216] 具有高度浓缩 VLA-4 结合抗体、适于 SC 或 IM 施用的制剂适用于治疗炎性疾病,诸如多发性硬化症(MS)。多发性硬化症为特征在于炎症及髓鞘损失的中枢神经系统疾病。

[0217] 具有 MS 的患者可通过建立如由 MS 诊断研讨会定义的临床上明确的 MS 诊断的标准来鉴别(Poser 等人,Ann. Neurol. 13 :227,1983)。简言之,具有临床上明确的 MS 的个体

已具有两次发作及两种病变的临床证据或一种病变的临床证据及另一独立病变的副临床(paraclinical)证据。确切的 MS 亦可通过两次发作及脑脊髓液中的 IgG 的寡克隆条带的证据或通过一次发作、两种病变的临床证据及脑脊髓液中的 IgG 的寡克隆条带的组合来诊断。马克当诺(McDonald)标准亦可用以诊断 MS。(McDonald 等人,2001, Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis(多发性硬化症的建议诊断标准:来自多发性硬化症诊断国际协作组的准则),Ann Neurol 50:121-127)。马克当诺标准包括不存在多次临床发作的情况下使用欲用于诊断 MS 的 CNS 损伤随时间的 MRI 证据。可以若干不同方式评估对多发性硬化症的有效治疗。以下参数可用以测定治疗有效性。两个示例性标准包括:EDSS(残疾状态扩展评分,extended disability status scale)及恶化在 MRI(磁共振成像)上的表现。EDSS 是对由 MS 造成的临床损伤评级的方法(Kurtzke, Neurology 33:1444,1983)。评估八个功能系统神经损伤的类型及严重程度。简言之,在治疗之前,评估患者以下系统中的损伤:锥体系统、小脑、脑干、感觉系统、肠及膀胱、视觉系统、大脑及其它。以规定时间间隔进行回访。评分范围从 0(正常)至 10(由 MS 造成死亡)。一整步的降低表明为有效治疗(Kurtzke, Ann. Neurol. 36:573-79,1994)。

[0218] 恶化定义为由 MS 造成且伴随适当新神经异常的新症状的表现(IFNBMS 研究组,前述)。另外,恶化须持续至少 24 小时且在之前保持稳定或改善至少 30 天。简言之,临床医师对患者进行标准神经学检查。根据神经学分级评分的变化将恶化分为轻度、中度或严重(Sipe 等人,Neurology 34:1368,1984)。测定每年恶化速率及无恶化患者的比例。

[0219] 对于这些测量的任一个,若在治疗组与安慰剂组之间无恶化或无复发患者的比率(rate)或比例在统计学上有显著差异,则疗法可视为有效。另外,亦可测量首次恶化的时间及恶化持续时间及严重程度。在此方面疗法有效性的测量为治疗组与对照组相比首次恶化时间或持续时间及严重程度在统计学上显著差异。大于一年、18 个月或 20 个月的无恶化或无复发时期尤其值得注意。

[0220] 亦可基于以下标准中的一或多个来评估施用第一药剂及任选地第二药剂的功效:通过限制稀释所测定的 MBP 反应性 T 细胞的频率、MBP 反应性 T 细胞系及集落的增殖反应、T 细胞系的细胞因子概况、及自患者建立的 MBP 的集落。功效由反应性细胞频率降低、与天然形式相比在改变肽中胸苷掺入减少、及 TNF 及 IFN- α 减少来显示。

[0221] 临床测量包括一年及两年间隔内的复发率,及 EDSS 变化,包括持续六个月的 EDSS 自 1.0 单位的基线的进展时间。在 Kaplan-Meier 曲线上,残疾持续进展的延迟显示有功效。其它标准包括 MRI 上 T2 影像的面积及体积的变化,及通过钆增强影像所测得的病变的数目及体积的变化。

[0222] 可使用 MRI 通过钆-DTPA-增强成像(McDonald 等人 Ann. Neurol. 36:14,1994)来测量活性病变,或通过 T₂-加权技术来测量病变位置及程度。简言之,获得基线 MRI。将相同成像平面及患者位置用于各后续研究。可选择定位及成像顺序以使病变检测至最大,且便于病变追踪。后续研究可使用相同定位及成像顺序。MS 病变的存在、位置及程度可由放射科医师测定。病变面积可示出且逐片合计总病变面积。可执行三个分析:新病变证据、活性病变的出现率、病变面积的变化百分比(Paty 等人,Neurology 43:665,1993)。由疗法带来的改善可通过个体患者与基线相比或治疗组相对于安慰剂组在统计学上显著的改善来

确定。

[0223] 与可以本文所述的方法治疗的多发性硬化症相关的示例性症状包括：视神经炎、复视、眼球震颤症、眼辨距不良、核间眼肌麻痹、运动及声音光幻视、瞳孔传入缺陷、轻瘫、单肢轻瘫、半身轻瘫、四肢轻瘫 (quadraparesis)、瘫痪、截瘫、偏瘫、四肢麻痹、四肢瘫痪 (quadraplegia)、痉挛状态、构音不良、肌肉萎缩、抽搐、抽筋、张力衰弱、阵挛、肌阵挛、肌纤维颤动、腿不宁征候群、足下垂、功能障碍性反射、感觉异常、麻木、神经痛、神经病性及神经性疼痛、勒米特氏症 (l' hermitte' s)、本体感受功能障碍、三叉神经痛、运动失调、意向震颤、辨距不良、前庭运动失调、眩晕、谈话运动失调、张力障碍、轮替运动障碍、频繁排尿、膀胱痉挛状态、弛缓性膀胱、逼尿肌 - 括约肌共济不能、勃起功能障碍、性快感缺失、性感缺失、便秘、急便感、大便失禁、抑郁症、认知功能障碍、痴呆、情绪波动、情绪不稳、欣快症、双极综合征、焦虑症、失语症、语言障碍、疲劳、乌特霍夫 (Uhthoff) 症状、胃食道逆流及睡眠病症。

[0224] MS 的每一情况均显示呈现及后续过程的若干模式中的一个。最通常地, MS 首先自身表现为一系列发作接着当症状不可思议减轻时表现为完全或部分好转, 仅稍后在稳定性阶段之后复发。此称作复发 - 缓解型 (RR) MS。原发性进行性 (PP) MS 特征在于逐渐临床衰退而无明显好转, 但可存在暂时性平稳状态或症状的微小减轻。继发性进行性 (SP) MS 以复发 - 缓解型过程开始接着稍后为原发性进行性过程。患者很少可具有其中疾病采取由急性发作打断的进行性路径的进行性复发 (PR) 过程。PP、SP 及 PR 有时集中在一起且称为慢性进行性 MS。

[0225] 少数患者经历恶性 MS, 其定义为迅速且持续的衰退, 导致显著残疾或甚至在疾病发作之后不久死亡。此衰退可通过施用本文所述的组合疗法来阻滞或减速。

[0226] 除在人类研究之外或在人类研究之前, 亦可使用动物模型评估使用两种药剂的功效。多发性硬化症的示例性动物模型为实验性自身免疫脑炎 (EAE) 小鼠模型, 例如, 如 Tuohy 等人 (J. Immunol. (1988) 141 :1126-1130)、Sobel 等人 (J. Immunol. (1984) 132 : 2393-2401) 及 Traugott (Cell Immunol. (1989) 119 :114-129) 中所述。在 EAE 诱导之前可向小鼠施用本文所述的第一及第二药剂。接着评估小鼠的特征性标准以测定在模型中使用两种药剂的功效。

[0227] 其它病症

[0228] 本文所述的制剂及方法亦可用以治疗其它炎性、免疫或自体免疫病症, 例如中枢神经系统的炎症 (例如, 除多发性硬化症之外的脑膜炎、视神经脊髓炎、神经肉状瘤病、CNS 脉管炎、脑炎及横贯性脊髓炎)、组织或器官移植排斥或移植物抗宿主病、急性 CNS 损伤, 例如, 中风或脊髓损伤; 慢性肾脏疾病; 过敏症, 例如过敏性哮喘; 1 型糖尿病; 炎性肠病, 例如 Crohn 病、溃疡性结肠炎; 重症肌无力; 肌肉纤维疼痛; 关节炎病症, 例如类风湿性关节炎、银屑病关节炎; 炎性 / 免疫皮肤病症, 例如银屑病、白斑症、皮炎、扁平苔癣; 全身性红斑性狼疮症; Sjogren 综合征; 血液癌症, 例如多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤; 实体癌症, 例如肉瘤或癌瘤, 例如肺、乳腺、前列腺、脑的肉瘤或癌瘤; 及纤维变性病症, 例如肺纤维化、骨髓纤维化、肝硬化、系膜增生性肾小球肾炎、新月体性肾小球肾炎、糖尿病性肾病及肾间质性纤维病。

[0229] 举例而言, 可皮下或肌肉内施用含有高浓度 VLA-4 结合抗体 (例如那他珠单抗)

的制剂以治疗这些及其它炎性、免疫或自体免疫病症。

[0230] 抗体产生

[0231] 可通过免疫作用,例如使用动物,或通过诸如噬菌体展示的体外方法产生与 VLA-4 结合的抗体。所有或部分 VLA-4 可用作免疫原。举例而言, $\alpha 4$ 亚基的细胞外区域可用作免疫原。在一实施方案中,经免疫动物含有具有天然、人类或部分人类免疫球蛋白基因座的产生免疫球蛋白的细胞。在一实施方案中,非人类动物包括人类免疫球蛋白基因的至少一个部分。举例而言,可用人类 Ig 基因座的大片段加工小鼠抗体产生缺陷型小鼠品系。使用杂交瘤技术,可制得且选择来源于具有所需特异性的基因的抗原特异性单克隆抗体。例如参见 XenoMouse™, Green 等人 Nature Genetics 7:13-21 (1994)、U. S. 2003-0070185、美国专利第 5,789,650 号及 WO 96/34096。

[0232] 亦可例如在啮齿动物中产生针对 VLA-4 的非人类抗体。非人类抗体可经人源化,例如,如在美国专利第 6,602,503 号、EP 239400、美国专利第 5,693,761 号及美国专利第 6,407,213 中所述。

[0233] EP 239 400 (Winter 等人) 描述通过以来自另一物种的互补决定区取代 (在给定可变区内) 一种物种的抗体互补决定区 (CDR) 来改变该抗体。因为 CDR 取代抗体含有显著较少的非人类组分,所以与真实嵌合抗体相比,CDR 取代抗体不太可能引发人类的免疫反应。(Riechmann 等人,1988, Nature 332,323-327; Verhoeyen 等人,1988, Science 239, 1534-1536)。通常通过使用重组核酸技术将鼠抗体的 CDR 取代至人类抗体中的相应区域中以产生编码所需经取代抗体的序列。可添加所需同种型 (通常对于 CH 而言为 γ I 且对于 CL 而言为 κ) 的人类恒定区基因区段,且人源化重链及轻链基因可共表达于哺乳动物细胞中以产生可溶性人源化抗体。

[0234] Queen 等人,1989 及 WO 90/07861 已描述包括以下操作的方法:通过计算机分析与原始鼠抗体的 V 区框架的最佳蛋白质序列同源性选择人类 V 框架区,且模拟鼠 V 区的三级结构以显示有可能与鼠类 CDR 相互作用的框架氨基酸残基。接着将这些鼠类氨基酸残基迭置于同源人类框架上。亦参见美国专利第 5,693,762 号;第 5,693,761 号;第 5,585,089 号;及第 5,530,101 号。Tempest 等人,1991, Biotechnology 9,266-271 将分别来源于 NEWM 及 REI 重链及轻链的 V 区框架用作标准以供 CDR 移植而不根本引入小鼠残基。使用 Tempest 等人的方法来构建基于 NEWM 及 REI 的人源化抗体的优势在于 NEWM 及 REI 可变区的三维结构由 X 射线晶体学已知且因此可模拟在 CDR 与 V 区框架残基之间的特定相互作用。

[0235] 非人类抗体可经修饰以包括插入人类免疫球蛋白序列 (例如在特定位置处的共有人类氨基酸残基) 的取代,例如在一或多个 (诸如至少五个、十个、十二个或所有) 以下位置: (在轻链的可变域的 FR 中) 4L、35L、36L、38L、43L、44L、58L、46L、62L、63L、64L、65L、66L、67L、68L、69L、70L、71L、73L、85L、87L、98L, 和 / 或 (在重链的可变域的 FR 中) 2H、4H、24H、36H、37H、39H、43H、45H、49H、58H、60H、67H、68H、69H、70H、73H、74H、75H、78H、91H、92H、93H, 和 / 或 103H (根据 Kabat 编号)。例如参见美国专利第 6,407,213 号。

[0236] 与 VLA-4 结合的完全人类单克隆抗体可例如使用体外接触抗原的人类脾细胞制造,如 Boerner 等人,1991, J. Immunol., 147,86-95 所述。其可通过全套克隆来制备,如由 Persson 等人,1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88:2432-2436 或由 Huang 及 Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141,227-236; 以及美国专利第 5,798,230 号所述。亦可使用大的未经

免疫人类噬菌体展示文库来分离可使用标准噬菌体技术开发为人类治疗剂的高亲和力抗体（例如参见 Vaughan 等人, 1996 ; Hoogenboom 等人 (1998) *Immunotechnology* 4 :1-20 ;及 Hoogenboom 等人 (2000) *Immunol Today* 2 :371-8 ;U. S. 2003-0232333）。

[0237] 抗体制造

[0238] 可在原核及真核细胞中制造抗体。在一实施方案中, 抗体（例如 scFvs）表达于诸如毕赤酵母 (*Pichia*)（例如参见 Powers 等人 (2001) *J Immunol Methods*. 251 :123-35）、汉逊氏酵母菌 (*Hansenula*) 或酵母 (*Saccharomyce*) 的酵母细胞中。

[0239] 在一实施方案中, 在哺乳动物细胞中制造抗体, 尤其全长抗体, 例如 IgG。用于重组表达的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢 (CHO 细胞)（包括在 Urlaub 及 Chasin(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 :4216-4220 中所述的 dhfr-CHO 细胞, 其与 DHFR 可选择标记一起使用, 例如, 如 Kaufman 及 Sharp(1982) *Mol. Biol.* 159 :601-621 中所述）、淋巴细胞系, 例如 NS0 骨髓瘤细胞及 SP2 细胞、COS 细胞、K562 及来自例如转基因哺乳动物的转基因动物的细胞。举例而言, 细胞为乳腺上皮细胞。

[0240] 除编码免疫球蛋白域的核酸序列之外, 重组表达载体亦可携带其它核酸序列, 诸如调控载体在宿主细胞中的复制的序列（例如复制起点）及可选择标记基因。可选择标记基因有助于选择已引入载体的宿主细胞（例如参见美国专利第 4, 399, 216 号、第 4, 634, 665 号及第 5, 179, 017 号）。示例性可选择标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因（适用于具有甲氨喋呤选择 / 扩增的 dhfr- 宿主细胞）及 neo 基因（用于 G418 选择）。

[0241] 在用于重组表达抗体（例如全长抗体或其抗原结合部分）的示例性系统中, 通过磷酸钙介导的转染将编码抗体重链及抗体轻链的重组表达载体引入 dhfr-CHO 细胞中。在重组表达载体中, 抗体重链及轻链基因各自与增强子 / 启动子调控元件（例如来源于 SV40、CMV、腺病毒及类似病毒, 诸如 CMV 增强子 / AdMLP 启动子调控元件或 SV40 增强子 / AdMLP 启动子调控元件）可操作连接以驱动基因的高水平转录。重组表达载体亦携带有 DHFR 基因, 其允许使用甲氨喋呤选择 / 扩增来选择已以载体转染的 CHO 细胞。培养所选转化子宿主细胞以允许表达抗体重链及轻链且自培养基中回收完整抗体。使用标准分子生物学技术制备重组表达载体, 转染宿主细胞, 选择转化子, 培养宿主细胞, 及自培养基回收抗体。举例而言, 一些抗体可通过亲和层析法使用蛋白 A 或蛋白 G 分离。举例而言, 使用标准蛋白质浓缩技术可将经纯化 VLA-4 抗体例如那他珠单抗浓缩至 100mg/mL 至约 200mg/mL。

[0242] 抗体亦可包括修饰, 例如改变 Fc 功能例如以降低或移除与 Fc 受体或 C1q 或两者相互作用的修饰。举例而言, 可使人类 IgG1 恒定区在一或多个残基处突变, 例如残基 234 及 237（例如根据美国专利第 5, 648, 260 号中的编号）中的一或多个。其它示例性修饰包括在美国专利第 5, 648, 260 号中所述的修饰。

[0243] 对于包括 Fc 域的一些抗体而言, 可设计抗体制造系统以合成 Fc 区经糖基化的抗体。举例而言, IgG 分子的 Fc 域在 CH2 域中的天冬酰胺 297 处经糖基化。此天冬酰胺为用于以双天线型寡糖修饰的位点。此糖基化参与由 Fc γ 受体及补体 C1q 介导的效应功能 (Burton 及 Woof(1992) *Adv. Immunol.* 51 :1-84 ; Jefferis 等人 (1998) *Immunol. Rev.* 163 : 59-76)。可使 Fc 域在将对应于天冬酰胺 297 的残基适当糖基化的哺乳动物表达系统中产生。Fc 域亦可包括其它真核翻译后修饰。

[0244] 抗体亦可由转基因动物产生。举例而言, 美国专利第 5, 849, 992 号描述在转基因

哺乳动物的乳腺中表达抗体的方法。构建包括乳腺特异性启动子及编码所关注抗体（例如本文所述的抗体）的核酸序列及用于分泌的信号序列的转基因。由这些转基因哺乳动物的雌性产生的乳液包括分泌于其中的所关注抗体，例如本文所述的抗体。可将抗体自乳液纯化，或对于一些应用而言直接使用。

[0245] 可将抗体例如以使其在循环（例如血液、血清、淋巴、支气管肺泡灌洗液）或其它组织中的稳定性和 / 或保留提高例如至少 1.5、2、5、10 或 50 倍的部分修饰。

[0246] 举例而言，可使 VLA-4 结合抗体与聚合物结合，该聚合物例如为基本上非抗原性聚合物，诸如聚氧化烯或聚氧化乙烯。合适聚合物的重量将显著变化。可使用具有介于约 200 道尔顿至约 35,000 道尔顿（或约 1,000 至约 15,000，及 2,000 至约 12,500）范围内的数均分子量的聚合物。

[0247] 举例而言，可使 VLA-4 结合抗体与水溶性聚合物结合，例如亲水性聚乙烯聚合物，例如聚乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮。这些聚合物的非限制性清单包括聚氧化烯均聚物，诸如聚乙二醇（PEG）或聚丙二醇，聚氧乙烯化多元醇、其共聚物及其嵌段共聚物，其限制条件为保持嵌段共聚物的水溶性。其它适用聚合物包括聚氧化烯，诸如聚氧乙烯、聚氧丙烯，及聚氧乙烯与聚氧丙烯的嵌段共聚物（Pluronic）；聚甲基丙烯酸酯；卡波姆（carbomer）；分枝或非分枝多糖，其包含糖单体 D- 甘露糖、D- 半乳糖及 L- 半乳糖、海藻糖、果糖、D- 木糖、L- 阿拉伯糖、D- 葡萄糖醛酸、唾液酸、D- 半乳糖醛酸、D- 甘露糖醛酸（例如聚甘露糖醛酸或褐藻酸）、D- 葡糖胺、D- 半乳糖胺、D- 葡萄糖及神经氨糖酸，其包括同多糖及异多糖，诸如乳糖、支链淀粉、淀粉、羟乙基淀粉、直链淀粉、硫酸葡聚糖、葡聚糖、糊精、糖原，或酸性粘多糖的多糖亚基，例如透明质酸；糖醇的聚合物，诸如聚山梨糖醇及聚甘露糖醇；肝素（heparin 或 heparon）。

[0248] 示例性第二药剂

[0249] 在一些情况下，本文所述的制剂，例如适于 SC 或 IM 施用的含有高浓度 VLA-4 结合抗体的制剂包括第二药剂，或与含有第二药剂的制剂组合施用。

[0250] 在一实施中，以共制剂形式提供 VLA-4 结合抗体及第二药剂，且向受治疗者施用该共制剂。另外可能例如在施用共制剂之前或之后 24 小时单独施用一剂量的高度浓缩抗体制剂且接着施用一剂量的含有第二药剂的制剂。在另一实施中，以独立制剂形式提供抗体及第二药剂，且施用步骤包括依次施用抗体及第二药剂。可在同一天（例如，在彼此一小时之内，或相隔至少 3、6 或 12 小时）或在不同天提供依次施用。

[0251] 抗体及第二药剂一般各自以时间独立的多个剂量形式施用。抗体及第二药剂一般各自根据方案来施用。用于一或两者的方案可具有规则周期性。用于抗体的方案可具有与第二药剂的方案不同的周期性，例如一个可比另一个更频繁地施用。在一实施中，抗体及第二药剂中的一个施用每周一次且另一个每月一次。在另一实施中，例如历经多于 30 分钟但少于 1、2、4 或 12 小时的时期连续施用抗体及第二药剂中的一个，且另一个以大丸剂形式施用。可通过任何适当方法，例如皮下、肌肉内或静脉内施用抗体及第二药剂。

[0252] 在一些实施方案中，抗体及第二药剂中的每一个以与各自单独疗法所规定的相同剂量施用。在其它实施方案中，抗体以等于或小于单独施用时功效所需量的剂量施用。同样地，第二药剂可以等于或小于单独施用时功效所需量的剂量施用。

[0253] 用于与 VLA-4 结合抗体组合治疗多发性硬化症的第二药剂的非限制性实例包括：

[0254] ●干扰素,例如人类干扰素 β -1a(例如,**AVONEX®**或**Rebif®**)及干扰素 β -1b(**BETASERON™**;在位置 17 处经取代的人类干扰素 β ;Berlex/Chiron);

[0255] ●乙酸格拉替美(glatiramer acetate)(亦称为共聚物 1、Cop-1;COPAXONE™;Teva Pharmaceutical Industries, Inc.)

[0256] ●**Rituxan®**(利妥昔单抗)或另一抗 CD20 抗体,例如与利妥昔单抗竞争或结合重迭表位的抗体;

[0257] ●米托蒽醌(mixtozantrone)(**NOVANTRONE®**, Lederle);

[0258] ●化疗剂,例如克拉屈滨(clabribine)(**LEUSTATIN®**)、硫唑嘌呤(**IMURAN®**)、环磷酰胺(**CYTOXAN®**)、环孢素-A(cyclosporine-A)、甲氨喋呤、4-氨基吡啶及替扎尼定;

[0259] ●皮质类固醇,例如甲泼尼龙(**MEDRONE®**, Pfizer)、强的松;

[0260] ●免疫球蛋白,例如 **Rituxan®**(利妥昔单抗);CTLA4 Ig;阿仑珠单抗(**MabCAMPATH®**)或达利珠单抗(结合 CD25 的抗体);

[0261] ●抑制素(statin);

[0262] ●TNF 拮抗剂。

[0263] 乙酸格拉替美为由氨基酸-谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸及酪氨酸的无规链形成的蛋白质(因此称为 GLATiramer)。其可在溶液中使用 N-羧基氨基酸酐以比率为约 5 份丙氨酸比 3 份赖氨酸、1.5 份谷氨酸及 1 份酪氨酸从这些氨基酸合成。

[0264] 其它第二药剂包括其它人类细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂,该其它人类细胞因子或生长因子例如 TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGF 及 PDGF。其它示例性第二药剂包括针对诸如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90 或其配体的细胞表面分子的抗体。举例而言,达利珠单抗为可改善多发性硬化症的抗 CD25 抗体。

[0265] 其它示例性抗体包括提供本文所述的药剂的活性的抗体,例如配合例如干扰素 β 受体的干扰素受体的抗体。一般而言,在第二药剂包括抗体的实施方案中,其与除 VLA-4 外或除 α 4 整联蛋白外的目标蛋白质,或至少除由第一药剂识别的 VLA-4 外的 VLA-4 上的表位结合。

[0266] 其它额外示例性第二药剂包括:FK506、雷帕霉素、霉酚酸吗啉乙酯(mycophenolate mofetil)、来氟米特(leflunomide)、非类固醇抗炎药(NSAID),例如磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗血栓剂、补体抑制剂、肾上腺素能剂、通过如本文所述的促炎性细胞因子干扰信号传输的药剂、IL-1 β 转化酶抑制剂(例如 Vx740)、抗 P7s、PSGL、TACE 抑制剂、T-细胞信号传输抑制剂,诸如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、硫唑嘌呤(azathioprine)、6-巯基嘌呤、血管收缩素转化酶抑制剂、如本文所述的可溶性细胞因子受体及其衍生物、抗炎细胞因子(例如 IL-4、IL-10、IL-13 及 TGF)。

[0267] 在一些实施方案中,可使用第二药剂来治疗 MS 的一或多种症状或副作用。这些药剂包括例如三环癸胺(amantadine)、氯苯胺丁酸(baclofen)、罂粟碱(papaverine)、美克利嗪(meclizine)、羟嗪(hydroxyzine)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)、环丙沙星(ciprofloxacin)、多库酯(docusate)、匹莫林(pemoline)、丹曲林(dantrolene)、

去胺加压素 (desmopressin)、地塞米松 (dexamethasone)、托特罗定 (tolterodine)、苯妥英 (phenytoin)、氧基羟丁宁 (oxybutynin)、比沙可啶 (bisacodyl)、文拉法辛 (venlafaxine)、阿米替林 (amitriptyline)、甲烯胺 (methenamine)、氯硝西洋 (clonazepam)、异烟肼 (isoniazid)、伐地那非 (vardenafil)、硝化呋喃妥因 (nitrofurantoin)、车前草亲水性胶浆剂、前列地尔 (alprostadil)、加巴喷丁 (gabapentin)、去甲替林 (nortriptyline)、帕罗西汀 (paroxetine)、丙胺太林溴 (propantheline bromide)、莫达非尼 (modafinil)、氟西汀 (fluoxetine)、非那吡啶 (phenazopyridine)、甲泼尼龙 (methylprednisolone)、痛痉宁 (carbamazepine)、丙咪嗪 (imipramine)、安定 (diazepam)、西地那非 (sildenafil)、安非他酮 (bupropion) 及舍曲林 (sertraline)。许多小分子第二药剂具有在 150 道尔顿与 5000 道尔顿之间的分子量。

[0268] TNF 拮抗剂的实例包括针对 TNF (例如人类 TNF α) 的嵌合、人源化、人类或体外产生的抗体 (或其抗原结合片段), 诸如 D2E7 (人类 TNF α 抗体, 美国专利第 6, 258, 562 号; BASF)、CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (人源化抗 TNF α 抗体; Celltech/Pharmacia)、cA2 (嵌合抗 TNF α 抗体; REMICADETM, Centocor); 抗 TNF 抗体片段 (例如 CPD870); TNF 受体的可溶性片段, 例如 p55 或 p75 人类 TNF 受体或其衍生物, 例如 75kdTNFR-IgG (75kd TNF 受体-IgG 融合蛋白, ENBRELTM; Immunex; 例如参见 Arthritis 及 Rheumatism (1994) 第 37 卷, S295; J. Invest. Med. (1996) 第 44 卷, 235A)、p55kdTNFR-IgG (55kd TNF 受体-IgG 融合蛋白 (LENERCEPTTM)); 酶拮抗剂, 例如 TNF α 转化酶 (TACE) 抑制剂 (例如, α -磺酰基羟肟酸衍生物, W001/55112, 及 N-羟基甲酰胺 TACE 抑制剂 GW3333、-005 或 -022); 及 TNF-bp/s-TNFR (可溶性 TNF 结合蛋白; 例如参见 Arthritis 及 Rheumatism (1996) 第 39 卷, 第 9 期 (增刊), S284; Amer. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology (1995) 第 268 卷, 第 37-42 页)。

[0269] 除第二药剂之外, 亦可能向受治疗者递送其它药剂。然而, 在一些实施方案中, 除 VLA-4 结合抗体及第二药剂外, 不向受治疗者施用药物组合物形式的蛋白质或生物剂。VLA-4 结合抗体及第二药剂可为通过注射递送的仅有药剂。在 VLA-4 结合抗体及第二药剂为重组蛋白质的实施方案中, VLA-4 结合抗体及第二药剂可为向受治疗者施用的仅有重组药剂, 或至少为调节免疫或炎性反应的仅有重组药剂。在其它实施方案中, VLA-4 结合抗体单独为向受治疗者施用的唯一重组药剂或唯一生物剂。

[0270] 本文中所包括的所有参考文献及公布均以引用的方式并入。以下实施例并不意欲具有限制性。

实施例

[0271] 实施例 1. 关于开发静脉内制剂的概述: 储存及结构稳定性. 进行实验以测定在 pH 值为 6 的 10mM 磷酸盐、140mM 氯化钠、0.02% 聚山梨酯 80 中含有 20mg/mL 那他珠单抗的那他珠单抗制剂的储存稳定性。对于不同储存条件数据组 (2-8°C 下历时 24 个月; 25°C 下历时 12 个月; 40°C 下历时 3 个月) 计算在制剂储存期间的稳定性变化速率。将以下参数用以评估与初始时间点相比的稳定性变化速率: 聚集百分比、氨基酸残基甲硫氨酸 255 的氧化百分比、所存在的半抗体的百分比、H+L 的百分比、断裂百分比、唾液酸化百分比及具有较低等电点 (pI) 的同种型的百分比。储存稳定性制剂开发试验的结果展示于表 2 中。这些结

果亦提供用于对含有较高抗体浓度的制剂进行稳定性研究的基线。

[0272] 表 2. 20mg/mL 制剂: 储存稳定性

[0273]

[0274]

属性	配制条件对降解的作用	储存期间的变化	储存期间的变化速率		
			2-8°C ¹	25°C ²	40°C ³
聚集%	最佳~pH 6	增大	N/C	每年~0.1%	每月~0.3%
Met255 氧化%	通过最小化过氧化物含量来优化	增大	N/C	N/C	每月~0.4-1%
半抗体%	最佳~pH 5-6, 赋形剂依赖型	增大	N/C	N/C	~1%/月
H+L%	最佳~pH 5-6.5	增大	N/C	N/C	~1.5%/月
断裂%	最佳~pH 5-6.5	减小	N/C	N/C	~1%/月
唾液酸化%	最佳~pH 5-6(预测)	减小	N/C	N/C	N/D
较低 pI 同种型 %	最佳~pH 5	增大	~1%/年	~1.8%/月	~14%/月

[0275] ¹ 使用 24 个月的实时数据计算的速率。² 使用 12 个月的数据组计算的速率。³ 使用 3 个月的数据组计算的速率。N/C- 无变化, N/D- 未测定。

[0276] 使用各种生物物理学技术来评估 20mg/mL 那他珠单抗制剂的结构稳定性, 其包括经由差示扫描热量测定 (DSC) 监测蛋白质二级结构、用荧光分光光度计经由色氨酸荧光监测色氨酸残基的环境、在远 UV 中经由圆二色性监测 IgG 折叠的三级结构及经由 UV 及可见分光光度测定法监测芳族残基的环境。

[0277] 部分通过以差示扫描量热计 (Microcal, Amherst, MA) 在热熔融实验期间监测 T_m (热熔融曲线的中点) 来优化 20mg/mL 制剂的结构稳定性。监测与缓冲液对照相比熔融蛋白质所需的过量焓且通过计算机分析数据。通过 UV 分光光度测定法以渐增的温度监测已知对结构稳定性敏感的色氨酸荧光以优化配制条件。同样, 于远 UV 区域中使用 UV 分光光度测定法来测量 IgG 折叠。监测六个峰, 且计算 UV-Vis 光谱 230-320nm 的二次导数以跟踪作为各种制剂中结构稳定性的量度的芳族残基环境。

[0278] 为评估 20mg/mL 那他珠单抗的稳定性而进行的结构性研究的结果展示于表 3 中。其它研究已展示那他珠单抗在以活塞泵抽吸期间经历异质成核。在多次冷冻 / 解冻循环之后未观察到抗体质量变化, 且抗体于小瓶中在延长的 2-3 天搅拌之后为稳定的 (数据展示于实施例 2 中)。那他珠单抗在强光应激存在下经历聚集、氧化及脱酰胺且当与不锈钢接触的情况下长期储存时亦对金属催化氧化作用敏感。

[0279] 表 3. 20mg/mL 制剂: 结构稳定性

[0280]

分子特性	技术	最佳配制条件
二级结构	DSC	最佳 pH 值在 7 与 8 之间 (基于在 68°C 下的 T_m)
色氨酸环境	荧光	pH 值为 ~ 7 (基于 pH 值在 4-9 之间时的最高开始温度)
IgG 折叠	远 UVCD	监测 215-218nm, 在无盐情况下最大 T_m 在 pH7
芳族残基环境	UV-Vis 峰的二次导数	监测 6 个峰, 最大 T_m 在 pH5 与 7 之间

[0281] 实施例 2. 150mg/mL 制剂的加速稳定性实验。为确定适于较高浓度那他珠单抗的制剂 (其将尤其适于皮下或肌肉内施用), 以各种制剂中的 150mg/mL 那他珠单抗进行加速稳定性实验。使测试制剂在 I 型 USP/EP 玻璃小瓶中在环境温度 (约 25°C) 下经历搅拌若干天。用于聚集研究中的制剂如下。HCN = 20mM 组氨酸、240mM 甘氨酸, pH 6。HOL = 20mM 组氨酸、240mM 甘油, pH 6。PCN = 20mM 磷酸盐、240mM 甘氨酸、pH 6。PST = 20mM 磷酸盐、140mM NaCl, pH 6。HOL 及 HCN 制剂具有额外 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80 (w/v)。除了在测试作为稳定性的变量 (下文实验 3) 时, PCN 及 PST 制剂具有额外 0.02% (w/v) 聚山梨酯 80。使用尺寸排阻层析法 (SEC) 来测量在搅拌前后的聚集百分比。

[0282] 搅拌前及搅拌后的可溶性聚集体含量展示于图 1 中。通过 SEC 测量可溶性聚集体的百分比, 且在 HOL 制剂 (20mM 组氨酸、240mM 甘油、0.04% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6) 中观察到可溶性聚集体百分比的最小变化。

[0283] 亦通过检测聚集体的 UV 吸光度来监测如上所述进行的加速稳定性测试。使用 UV 分光光度计通过以 1cm 光程在 UV/Vis 分光光度计中测量在如上所述 HCN、HOL、PCN 及 PST 缓冲液中浓度为 150mg/mL 的那他珠单抗溶液在 340nm 下的吸光度来监测搅拌前及搅拌后聚集体的存在。

[0284] 对搅拌前及搅拌后各种制剂中那他珠单抗 (150mg/mL) 聚集的 UV 吸光度研究的结果可见于图 2 中。在这些条件下组氨酸制剂 (HOL 及 HCN) 最稳定, 如通过 340nm 下表明较少聚集的较低吸光度所证明。在 40°C 下储存 1 个月之后在磷酸盐制剂中观察到不可溶沉淀, 但在组氨酸制剂中未观察到。

[0285] 表 4 比较 20mg/mL 及 150mg/mL 制剂的稳定性属性。结果表明 20mg/mL 与 150mg/mL 制剂具有类似稳定性。

[0286] 表 4. 在 20mg/mL 及 150mg/mL 下的稳定性属性

[0287]

属性	平均变化速率, 5°C, 每年	
	20 mg/ml	150 mg/mL
通过 SEC 测定的聚集	< 0.5%	< 0.5%
酸性同种型	~1%	~1%
氧化	< 0.5%	< 0.5%
纯度(H+L%)	< -0.5%	< -0.5%
效价	无变化	无变化

[0288] 实施例 3. 聚山梨酯-80 对那他珠单抗具有增溶作用。研究聚山梨酯-80 含量对 20mg/mL 及 150mg/mL 那他珠单抗的增溶作用。以各种浓度 (w/v) 将聚山梨酯-80 添加至 HOL 缓冲液中的 20mg/mL 及 150mg/mL 那他珠单抗中。通过在 40°C 下搅拌如上所述的物质历时 8 周来进行加速稳定性测试。通过如上文实施例中所述的 SEC 测量聚集百分比。

[0289] 在搅拌期间聚山梨酯-80 含量对那他珠单抗稳定性的作用展示于图 3 中, 其展示在 135-165mg/mL 下的那他珠单抗的数据。在搅拌实验期间关于稳定性的最小聚山梨酯-80 含量对于 150mg/mL 那他珠单抗而言为约 0.03% (w/v), 且对于 20mg/mL 那他珠单抗为 0.02% (w/v)。因此优选的聚山梨酯-80 浓度根据抗体浓度而变化。

[0290] 实施例 4. 那他珠单抗在不同温度下的长期储存。如上文实施例 2 中所述通过使用尺寸排阻层析法测量聚集百分比, 来评估在各种制剂中且在 2-8°C 之间及在 40°C 下的 150mg/mL 那他珠单抗的稳定性。那他珠单抗 (150mg/mL) 在如上文实施例 2 中所述的 HCN、HOL、PCN 或 PST 缓冲液中。历经五个月收集在 40°C 下储存的那他珠单抗的数据; 历经 24 个月收集在 2-8°C 之间储存的那他珠单抗。

[0291] 在 40°C 下那他珠单抗 (150mg/mL) 的各种制剂对于储存的稳定性作用的结果展示于图 4 中; 2-8°C 储存的结果展示于图 5 中。PST 制剂 (20mM 磷酸盐、140mM NaCl、0.02% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6) 中浓度为 150mg/mL 的那他珠单抗在 40°C 下聚集最少。当将抗体储存在 2-8°C 下历时 24 个月时未观察到聚集的显著差异。这些数据证明 PST 制剂中的高浓度那他珠单抗尤其稳定。

[0292] 实施例 5. 在磷酸盐制剂中那他珠单抗的甲硫氨酸氧化减少。通过以 UV-HPLC 表征 endoLysC 肽图来研究甲硫氨酸残基在那他珠单抗 (150mg/mL) 的各种制剂中氧化趋势, 及游离甲硫氨酸 (10mM) 的保护作用。在 2-8°C 之间及 40°C 下将那他珠单抗 (150mg/mL) 储存于组氨酸及磷酸盐制剂 (如实施例 2 中所述的 HOL、HCN、PST 及 PCN) 中历时至多 24 个月。以经氧化甲硫氨酸的百分比形式表述的结果展示于图 6 中。对于磷酸盐制剂而言, 在 150mg/mL 那他珠单抗中甲硫氨酸的氧化显著减少且在两个温度范围内均以与组氨酸制剂相比较低的速率发生。

[0293] 当与储存在 40°C 下历经六个月的时间段的那他珠单抗 (150mg/mL) 的无甲硫氨酸制剂相比时, 可见诸如 HOL 的组氨酸制剂中过量游离甲硫氨酸 (L-met) 的抗氧化剂作用 (图 7)。如上所述量化甲硫氨酸氧化的百分比。因此, 在磷酸盐缓冲液中以 150mg/mL 配制那他珠单抗对甲硫氨酸氧化更具保护性, 且减少在 150mg/mL 下稳定所需的赋形剂的数量。

[0294] 实施例 6. 断裂速率在组氨酸缓冲液中比在磷酸盐缓冲液中大。历时 8 周随时间比较各种制剂 (HOL: 20mM 组氨酸、240mM 甘油、0.04% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6, 及 PST: 20mM

磷酸盐、140mM NaCl、0.02% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6) 中的那他珠单抗 (20mg/mL、50mg/mL、75mg/mL 及 150mg/mL) 的断裂速率。通过非还原性 GelChip 毛细管电泳法测量半抗体百分比来量化断裂。

[0295] 图 8 中展示断裂研究的结果, 其测量那他珠单抗在四个不同浓度下 (20mg/mL、50mg/mL、75mg/mL 及 150mg/mL) 且在两种不同制剂 (HOL: 20mM 组氨酸、240mM 甘油、0.04% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6; 及 PST: 20mM 磷酸盐、140mM NaCl、0.02% (w/v) 聚山梨酯 80, pH 6) 中随时间的半抗体百分比。铰链裂解速率在磷酸盐中比在组氨酸制剂中低。组氨酸制剂环境比磷酸盐制剂环境更具还原性 (基于氧化还原电位)。

[0296] 实施例 7. 适于皮下或肌肉内施用的那他珠单抗的示例性制剂。鉴于上文实验, 对于适于 SC 或 IM 施用的高度浓缩那他珠单抗组合物而言, 基于磷酸盐的制剂经测定为最佳。组合物亦可经稀释且用于 IV 施用。上文实验表明那他珠单抗当储存于磷酸盐制剂 (诸如 PST 及 PCN) 中时比储存于组氨酸制剂 HOL 及 HCN 中时不易于氧化。因此, 在磷酸盐制剂中通常不需要游离甲硫氨酸来防止那他珠单抗氧化 (参见实施例 5)。亦观察到磷酸盐制剂 PST 中的那他珠单抗的断裂速率比在组氨酸制剂 HOL 中的速率小 (参见实施例 6)。在磷酸盐制剂 PST 及 PCN 中的长期稳定性好于在组氨酸制剂 HOL 及 HCN 中的。

[0297] 在一些实施方案中, 下文提供的制剂的组分中的每一个可变化 10%。

[0298] 实施例 8

[0299] 示例性制剂

[0300] 150mg/mL 那他珠单抗

[0301] 10mM 磷酸钠缓冲液

[0302] 140mM 氯化钠

[0303] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80

[0304] 将 pH 值调节为 pH 6.0 ± 0.5

[0305] 实施例 9

[0306] 示例性制剂

[0307] 150mg/mL 那他珠单抗

[0308] 10mM 磷酸钠缓冲液

[0309] 275mM 甘油

[0310] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80

[0311] 将 pH 值调节为 pH 6.0 ± 0.5

[0312] 实施例 10

[0313] 示例性制剂

[0314] 150mg/mL 那他珠单抗

[0315] 10mM 磷酸钠缓冲液

[0316] 160mM L-精氨酸盐酸盐

[0317] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80

[0318] 将 pH 值调节为 pH 6.0 ± 0.5

[0319] 实施例 11

[0320] 示例性制剂

- [0321] 150mg/mL 那他珠单抗
[0322] 10mM 磷酸钠缓冲液
[0323] 9% (w/v) 蔗糖
[0324] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80
[0325] 将 pH 值调节为 pH 6.0±0.5

[0326] 实施例 12

- [0327] 示例性制剂
[0328] 150mg/mL 那他珠单抗
[0329] 10mM 磷酸钠缓冲液
[0330] 9% (w/v) 山梨糖醇
[0331] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80
[0332] 将 pH 值调节为 pH 6.0±0.5

[0333] 实施例 13

- [0334] 示例性制剂
[0335] 150mg/mL 那他珠单抗
[0336] 20mM L- 组氨酸
[0337] 240mM 甘油
[0338] 10mM L- 甲硫氨酸
[0339] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80
[0340] 将 pH 值调节为 pH 6.0±0.5

[0341] 实施例 14

- [0342] 示例性制剂
[0343] 150mg/mL 那他珠单抗
[0344] 20mM L- 组氨酸
[0345] 240mM 甘油
[0346] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80
[0347] 将 pH 值调节为 pH 6.0±0.5

[0348] 实施例 15. 稳定性数据

[0349] 将上文如实施例 8 提供的制剂储存于桩式针头注射器中, 且在不同时点测量稳定性数据。将这些数据概述于下表中且表明制剂当在 5℃ 下储存于注射器中时稳定至少 18 至 24 个月。

[0350] 制剂

- [0351] 150mg/mL 那他珠单抗
[0352] 10mM 磷酸钠缓冲液
[0353] 140mM 氯化钠
[0354] 0.04% (w/v) 聚山梨酯 80
[0355] 将 pH 值调节为 pH 6.0±0.5

[0356] 聚集体:

[0357]

时间, 月	在 5℃ 下储存期间的聚集体%
0	0.7
1	0.7
2	0.7
3	0.7
6	0.8
8	0.9
12	1.0
18	1.1

[0358] 效价：

[0359]

时间, 月	在 25℃ 下的相对效价
0	100
8	101
12	97

[0360] 较低 pI 同种型：

[0361]

时间, 月	在 5℃ 下储存期间的较低 pI 同种型%
0	15.2
1	15.4
2	15.1
3	15.6
6	13.5
8	13.3
12	15.0

[0362] 纯度（重链 + 轻链%）：

[0363]

时间, 月	在 5℃ 下储存期间的 H+L %
0	100
1	100
2	100
3	100
8	98.8
12	100

[0364] 已描述本发明的许多实施方案。然而, 应了解在不悖离本发明的精神及范围的情况下可进行各种修改。因此, 其它实施方案在以下权利要求的范围内。

序列表

<110> 比奥根艾迪克 MA 公司 (BIOGEN IDEC MA INC.)

<120> 抗体制剂

<130>B2047-7051W0

<140>

<141>

<150>60/944, 076

<151>2007-06-14

<160>2

<170>PatentIn Ver. 3.3

<210>1

<211>213

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的构建体

<400>1

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	Lys	Thr	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Lys	Tyr
			20					25					30		
Met	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35					40					45		
His	Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu	Gln	Pro	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50					55					60		
Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
			65					70					75		80
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Asn	Leu	Trp	Thr

	85		90		95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro					
100		105		110	
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr					
115		120		125	
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys					
130		135		140	
Val Cln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu					
145		150		155	
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser					
165		170		175	
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala					
180		185		190	
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe					
195		200		205	
Asn Arg Gly Glu Cys					

210

<210>2

<211>450

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的构建体

<400>2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
1	5	10	15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr					
20	25	30			
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met					
35	40	45			
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe					
50	55	60			
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr					
65	70	75	80		
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
85	90	95			

Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala Met Asp Tyr		
100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
115	120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser		
130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
145	150	155
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val		
195	200	205
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys		
210	215	220
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp		

				405					410					415			
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His		
				420					425					430			
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu		
				435				440						445			
Gly	Lys																
				450													

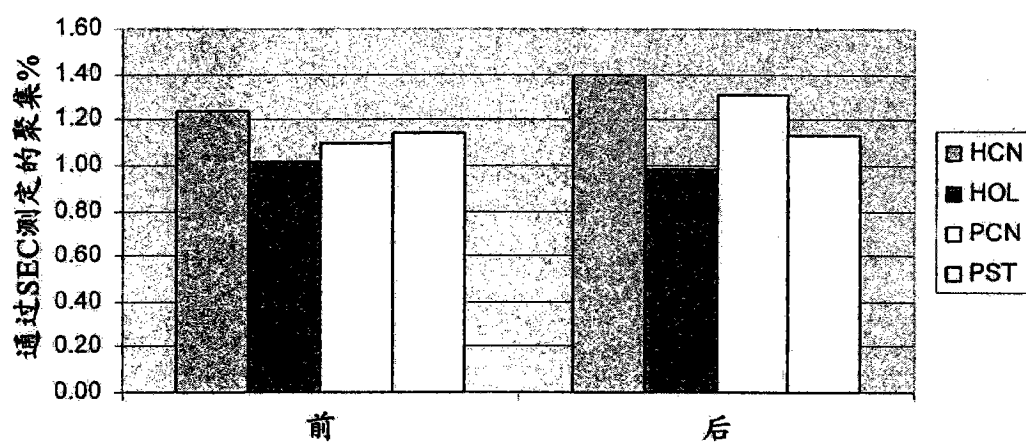


图 1

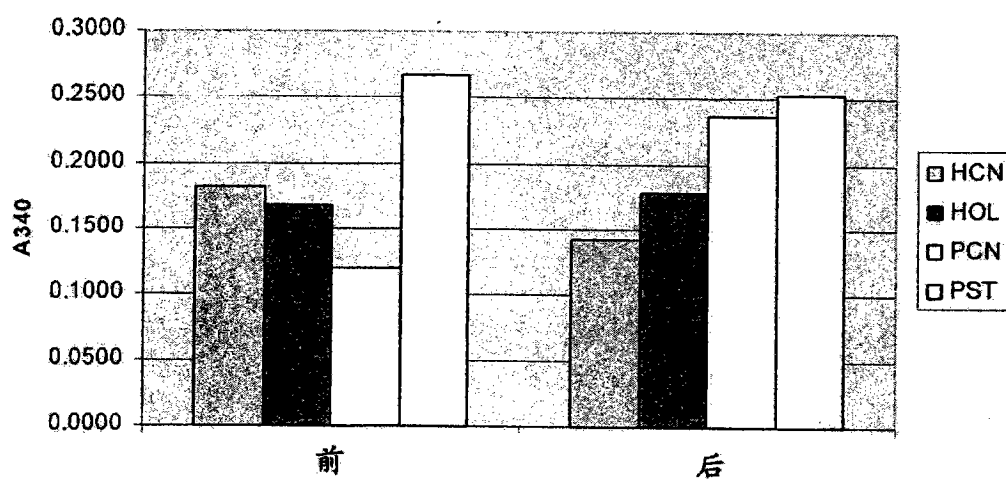


图 2

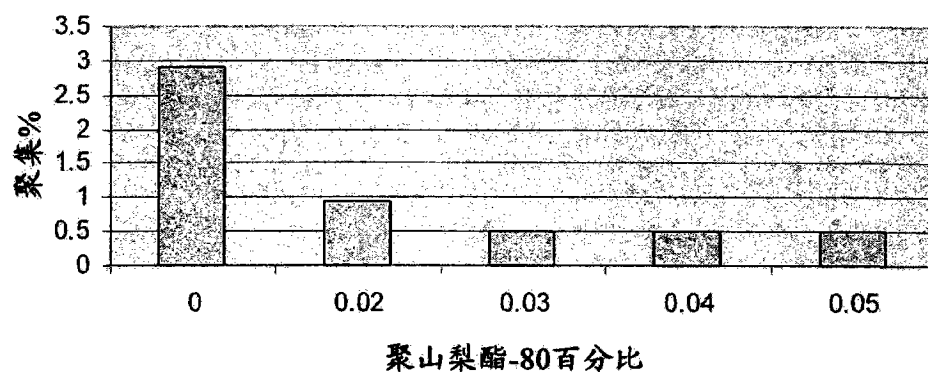


图 3

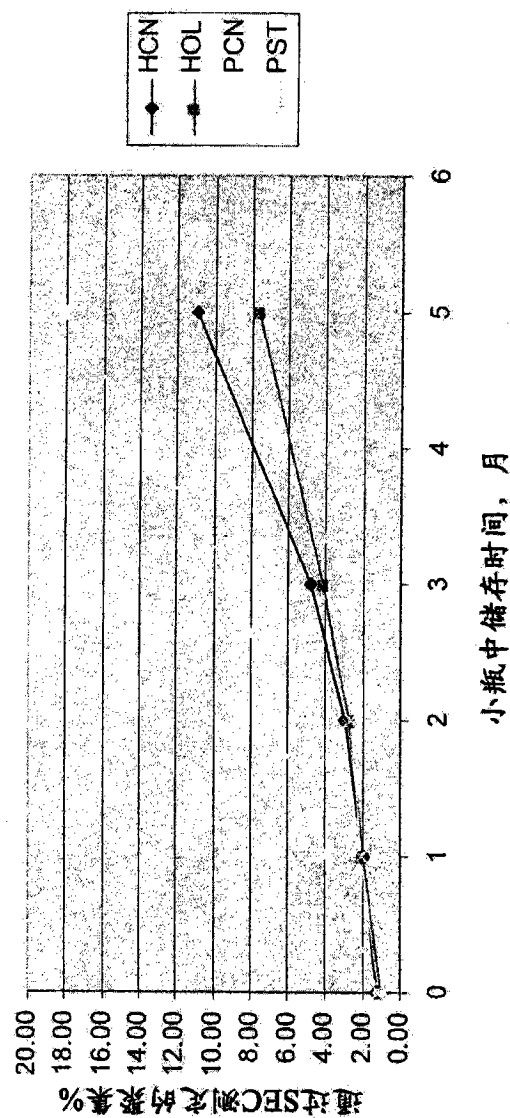


图 4

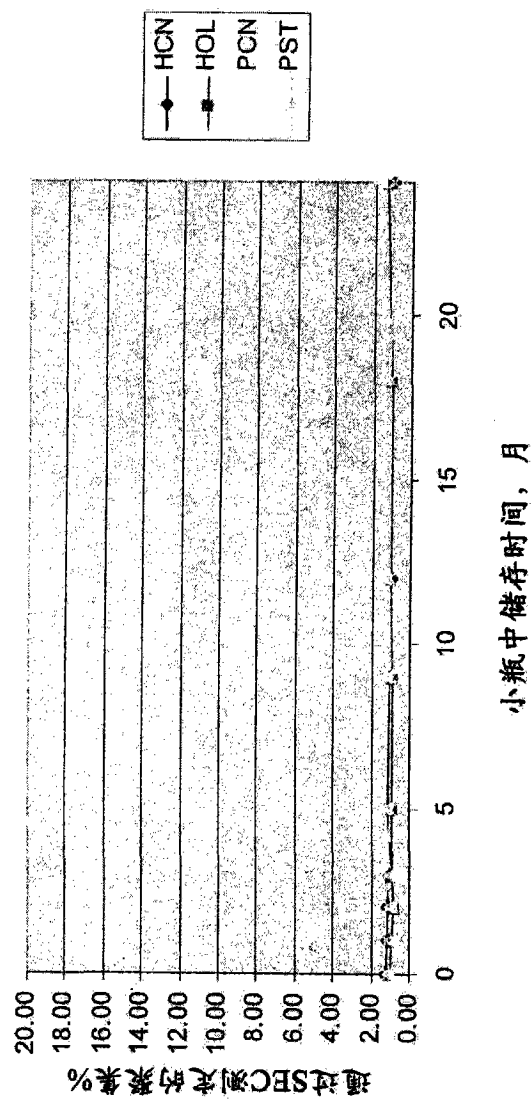


图 5

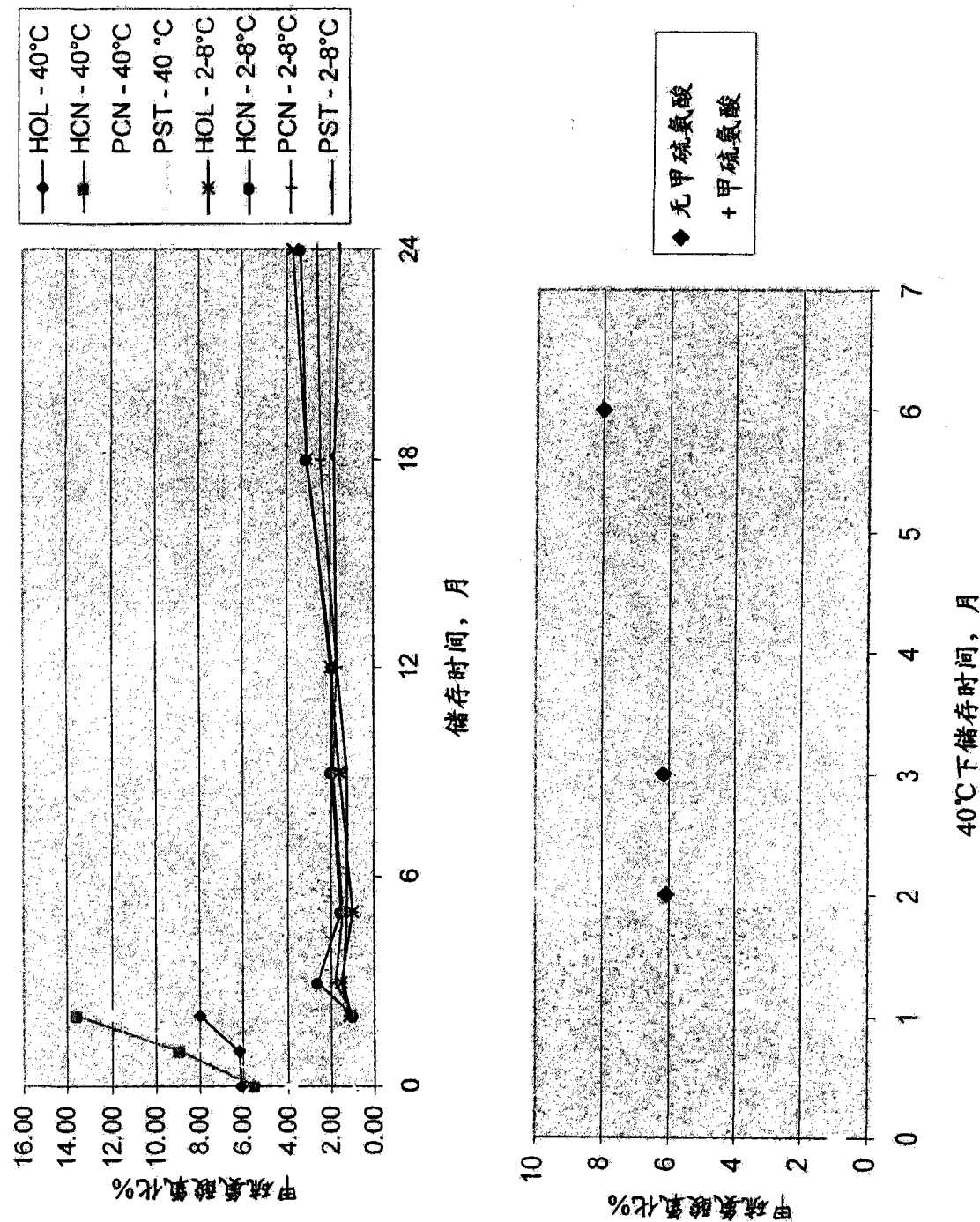


图 6

图 7

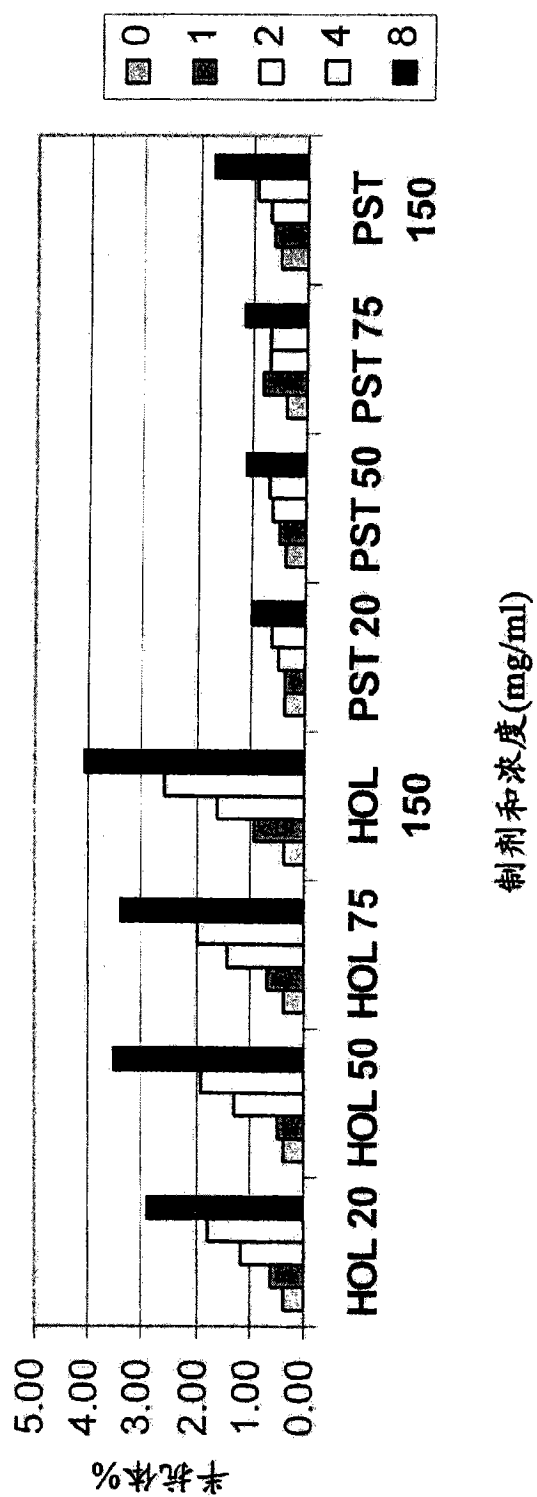


图 8