



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103533959 B

(45)授权公告日 2018.06.05

(21)申请号 201280021789.8

马里亚·罗萨里奥

(22)申请日 2012.05.02

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司
11287

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103533959 A

代理人 沈锦华

(43)申请公布日 2014.01.22

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

61/481,522 2011.05.02 US

61/544,054 2011.10.06 US

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/12(2006.01)

A61K 47/14(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.11.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/036069 2012.05.02

(56)对比文件

CN 101533504 A,2009.10.07,

CN 101820912 A,2010.09.01,

Feagan BG et al.Treatment of active
Crohn's disease with MLN0002,a humanized
antibody to the $\alpha 4 \beta 7$ integrin.《Clin
Gastroenterol hepatol》.2008,第6卷(第12
期),第1370—1377页.

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/151247 EN 2012.11.08

(73)专利权人 米伦纽姆医药公司

地址 美国马萨诸塞州

审查员 冯晓亮

(72)发明人 威尔洛·迪卢齐奥 方·M·源

乔纳德·M·瓦尔加

维斯阿纳桑·帕拉尼阿帕安

贾森·布朗 欧文·H·福克斯

凯瑟琳·肖尔茨 海伦·詹金斯

权利要求书1页 说明书65页

序列表14页 附图18页

(54)发明名称

抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体的制剂

(57)摘要

本发明描述包含抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体、抗氧化剂或螯合剂和至少一种游离氨基酸的混合物的抗体制剂。公开的制剂可具有提高的稳定性、减少的聚集体形成或其两者。本发明进一步提供这些抗体制剂的一种易于遵循且在体内产生治疗有效量的所述抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体的安全给药方案。

1. 一种稳定液体药物制剂,所述制剂包含至少140mg/ml的抗 α 4 β 7抗体、柠檬酸盐、至少一种游离氨基酸和聚山梨醇酯,其中所述抗 α 4 β 7抗体包括轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:4的氨基酸20-131;所述重链可变区包括SEQ ID NO:2的氨基酸20-140,其中所述抗 α 4 β 7抗体与所述柠檬酸盐的摩尔比是1:4至1:100。
2. 如权利要求1所述的稳定液体药物制剂,其中所述游离氨基酸选自以下组成的组:组氨酸、丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸以及其组合。
3. 如权利要求1所述的稳定液体药物制剂,其中所述柠檬酸盐与所述聚山梨醇酯的摩尔比是3:1至156:1。
4. 一种稳定液体药物制剂,所述制剂包含至少140mg/ml抗 α 4 β 7抗体、20mM至30mM柠檬酸盐、10mM至75mM组氨酸、0.01%至0.5%聚山梨醇酯80,以及50mM至150mM精氨酸,其中所述抗 α 4 β 7抗体包括轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:4的氨基酸20-131;所述重链可变区包括SEQ ID NO:2的氨基酸20-140,以及其中所述制剂具有6.1至6.9的pH。
5. 如权利要求1所述的稳定液体药物制剂,其中所述聚山梨醇酯是聚山梨醇酯80,且其中聚山梨醇酯80与抗 α 4 β 7抗体的摩尔比是0.7:1至2.0:1。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的稳定液体药物制剂,其中所述抗体是维多珠单抗。
7. 一种制品,所述制品包括容器、如权利要求1至6中任一项所述的稳定液体药物制剂及其使用说明书。
8. 如权利要求7所述的制品,所述稳定液体药物制剂包括108mg的抗体。
9. 一种如权利要求1至6中任一项所述的稳定液体药物制剂在制备用于治疗人患者的炎性肠病的药物中的用途,其中所述制剂的量是有效治疗所述炎性肠病的量。
10. 如权利要求9所述的用途,其中所述炎性肠病是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的制剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2011年10月6日提交的美国临时申请61/544,054和2011年5月2日提交的美国临时申请61/481,522的优先权。前述申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已通过EFS网以ASCII格式提交且据此以全文引用的方式并入本文的序列表。2012年4月30日创建的所述ASCII拷贝名为92596603.txt且大小为16,986字节。

[0005] 发明背景

[0006] 生物技术的进步使得有可能使用重组DNA技术产生多种蛋白质用于药物应用。因为蛋白质比传统有机和无机药物更大且更复杂(即除复杂三维结构外还具有多个官能团),所以配制所述蛋白质会造成特殊问题。为了使蛋白质保持生物活性,制剂必须保持蛋白质氨基酸的至少一个核心序列的构象完整性,同时保护蛋白质的多个官能团免遭降解。蛋白质可遭受缺乏稳定性,并且单克隆和多克隆抗体特别可相对不稳定(参见例如Wang等,上Pharm Sci.96:1-26(2007))。许多配制选项是可用的,但没有一种方法或系统适于所有蛋白质。已报道待考虑的若干因素(参见例如Wang等)。

[0007] 许多特征可影响蛋白质的稳定性。实际上,即使在纯化抗体的情况下,抗体结构也可能是异质的,这进一步使配制所述系统复杂化。此外,包括于抗体制剂中的赋形剂优选使任何潜在免疫反应减至最小。

[0008] 在抗体的情况下,保持构象完整性甚至更加重要。蛋白质的降解

[0009] 路径可涉及化学不稳定性(即涉及通过键形成或裂解来修饰蛋白质,

[0010] 从而产生新化学实体的任何过程)或物理不稳定性(即蛋白质的更高级结构变化)。化学不稳定性以例如脱酰胺、异构化、水解、氧化、片

[0011] 段化、聚糖 β 消除或双硫键互换(disulfide exchange)形式表现。物理不稳定性可由例如变性、聚集、沉淀或吸附造成。四种最常见蛋白质降解路径是蛋白质片段化、聚集、脱酰胺和氧化。治疗性蛋白质的化学或物理不稳定性的后果包括有效施用剂量减少、疗法的安全性归因于例如刺激或免疫反应性而降低以及归因于存放期较短而使制造更频繁。

[0012] 数项公布已大体上公开治疗炎性肠病的各种方法,并且提供用于施用旨在治疗炎性肠病的药剂的给药方案。举例而言,W096/24673公开粘膜血管地址素(addressin)及对与因白细胞结合于表达MAdCAM的细胞所致的白细胞募集至胃肠道相关的疾病的治疗。U.S.2005/0095238描述治疗与白细胞浸润粘膜组织相关的疾病的方法及向人施用有效量的对 $\alpha 4\beta 7$ 整合素(integrin)具有结合特异性的人或人源化免疫球蛋白或抗原结合片段。U.S.2005/0095238进一步描述各种剂量(例如每千克体重0.15mg、约0.5mg、约1.0mg、约1.5mg或约2.0mg免疫球蛋白或片段)和剂量之间的各种间隔(7天、14天、21天、28天或30天)。然而,以上提及的专利和公布并未公开本文中描述且要求的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的特定制剂或特定剂量和给药方案。重要的是,以上提及的专利并未公开为本文中描述且要求的治疗方法(由临床试验数据支持)提供的制剂、剂量和给药方案。

[0013] 本发明的抗体制剂可适用于抑制白细胞结合于表达MAdCAM的细胞且因此帮助治

疗患者的炎性肠病。因此,急需发现这些化合物的适合剂量和给药时程,并且急需开发在长时间段内以稳定及适宜形式产生稳态治疗有效血液含量的抗体制剂的制剂,优选为皮下制剂。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及鉴定作为适用于配制抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的赋形剂的抗氧化剂或螯合剂和至少一种氨基酸,所述制剂的不稳定性使其易经受脱酰胺、氧化、异构化和/或聚集。制剂会提高稳定性,减少聚集体形成且延迟其中抗体的降解。

[0016] 因此,在第一方面,本发明涉及一种稳定液体药物制剂,所述制剂包含抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、抗氧化剂或螯合剂和至少一种游离氨基酸的混合物。

[0017] 在一些实施方案中,稳定液体药物制剂在室温下12个月之后具有小于约1.0%的聚集体形成。稳定液体药物制剂在室温下12个月之后可具有小于约0.2%的聚集体形成。

[0018] 在一些实施方案中,抗氧化剂或螯合剂是柠檬酸盐。在一些实施方案中,螯合剂是EDTA。

[0019] 在一些实施方案中,制剂的游离氨基酸为组氨酸、丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸或其任何组合。制剂可包含约50mM至约175mM之间的游离氨基酸。制剂可包含约100mM与约175mM之间的游离氨基酸。游离氨基酸与抗体的摩尔比可为至少250:1。

[0020] 制剂也可含有表面活性剂。表面活性剂可为聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆(poloxamer)或其任何组合。

[0021] 在一些实施方案中,抗氧化剂与表面活性剂的摩尔比是约3:1至约156:1。

[0022] 制剂可具有介于约6.3与约7.0之间的pH。制剂的pH可在约6.5与约6.8之间。制剂可具有介于约6.1与约7.0之间或介于约6.2与6.8之间的pH。

[0023] 在一些实施方案中,稳定液体药物制剂含有至少约60mg/ml至约160mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。制剂可含有至少约160mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。制剂可含有约150mg/ml至约180mg/ml抗体或约165mg/ml抗体。

[0024] 在另一方面,本发明涉及一种稳定液体药物制剂,所述制剂包含至少约60mg/ml至约160mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、缓冲剂和至少约10mM柠檬酸盐。缓冲剂可为组氨酸缓冲剂。

[0025] 在另一方面,本发明涉及一种稳定液体药物制剂,所述制剂包含至少约60mg/ml至约180mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、缓冲剂和至少约5mM柠檬酸盐。缓冲剂可为组氨酸缓冲剂。

[0026] 在另一方面,本发明涉及一种稳定液体药物制剂,所述制剂包含至少约160mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体和至少约10mM柠檬酸盐。制剂可进一步含有聚山梨醇酯80。

[0027] 在另一方面,本发明涉及一种稳定液体药物制剂,所述制剂包含约160mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体和至少约5mM柠檬酸盐。制剂可进一步含有聚山梨醇酯80。

[0028] 在另一方面,本发明涉及一种稳定液体药物制剂,所述制剂包含抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、柠檬酸盐、组氨酸、精氨酸和聚山梨醇酯80的混合物。制剂可存在于容器(如小瓶、药筒、注射器或自动注射器)中。

[0029] 本发明的稳定液体药物制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可为维多珠单抗(vedolizumab)。本发明的制剂可用于皮下、静脉内或肌内施用。

[0030] 在一些方面,制剂可使抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的免疫原性减至最小。

[0031] 在另一方面,本发明涉及一种治疗炎性肠病的方法,所述方法包括向有需要的患

者施用本文所述的稳定液体药物制剂。施用可为皮下施用施用可为自身施用。

[0032] 在另一方面,本发明涉及一种制品,所述制品包括容器、本文所述的稳定液体药物制剂及其使用说明书。

[0033] 在一个方面,本发明涉及一种治疗罹患炎性肠病的人患者的方法,其中所述方法包括步骤:向罹患炎性肠病的患者施用对人 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段,其中根据以下给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段:(a)例如在诱导期治疗方案中,每隔一天以皮下注射液形式施用165mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的初始剂量持续六剂;(b)随后例如在维持期治疗方案中,在第6周时,视需要每两周或每四周以皮下注射液形式施用165mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第七剂量和后续剂量;其中给药方案诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解;并且此外,其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性,其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)以及重链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3):轻链:CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11;重链:CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、CDR3SEQ ID NO:14。

[0034] 在一个方面,本发明涉及一种治疗罹患炎性肠病的人患者的方法,其中所述方法包括步骤:向罹患炎性肠病的患者施用对人 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段,其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段包含非人来源的抗原结合区和至少一部分人来源的抗体,其中根据包括静脉内剂量的诱导期和皮下剂量的维持期的以下给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段:(a)以静脉内输液形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的初始静脉内剂量;(b)随后在初始剂量之后约两周时,以静脉内输液形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第二静脉内后续剂量;(c)随后从第六周开始,视需要每周、每两周、每三周或每四周以皮下注射液形式施用165mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第三剂量和后续剂量;其中给药方案诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解;并且此外,其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性,其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)以及重链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3):轻链:CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11;重链:CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、CDR3SEQ ID NO:14。

[0035] 在另一方面,本发明涉及一种用于治疗性治疗炎性肠病的给药方案,其中所述给药方案包括步骤:向罹患炎性肠病的患者施用对人 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段,其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段包含非人来源的抗原结合区和至少一部分人来源的抗体,其中根据皮下或肌内给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段,所述给药方案维持免疫球蛋白或其抗原结合片段的平均稳态谷底血清浓度为约9 $\mu\text{g/mL}$ 至约13 $\mu\text{g/mL}$;其中给药方案诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解;并且此外,其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性,其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)以及重链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3):轻链:CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11;重链:CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、

CDR3SEQ ID NO:14。

[0036] 在另一方面,本发明涉及一种用于治疗性治疗炎性肠病的给药方案,其中所述给药方案包括步骤:向罹患炎性肠病的患者施用对人 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段,其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段包含非人来源的抗原结合区和至少一部分人来源的抗体,其中根据皮下或肌内给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段,所述给药方案维持人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的平均稳态谷底血清浓度为约35 $\mu\text{g/mL}$ 至约40 $\mu\text{g/mL}$;其中给药方案诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解;并且此外,其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性,其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)以及重链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3):轻链:CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11;重链:CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、CDR3SEQ ID NO:14。

[0037] 在另一方面,本发明涉及一种治疗罹患炎性肠病的人患者的方法,其中所述方法包括步骤:向罹患炎性肠病的患者施用对人 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段,其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段包含非人来源的抗原结合区和至少一部分人来源的抗体,其中根据以下给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段:(a)施用通过约六周的初始给药,足以实现人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的平均谷底血清浓度为约20 $\mu\text{g/mL}$ 至约30 $\mu\text{g/mL}$ 的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的多个诱导期剂量;(b)随后视需要施用维持免疫球蛋白或其抗原结合片段的平均稳态谷底血清浓度为约9 $\mu\text{g/mL}$ 至约13 $\mu\text{g/mL}$ 或约35 $\mu\text{g/mL}$ 至40 $\mu\text{g/mL}$ 的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的多个维持期剂量;其中给药方案诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解;并且此外,其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性,其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)以及重链可变区的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3):轻链:CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11;重链:CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、CDR3SEQ ID NO:14。

[0038] 在一些方面,制剂、治疗方法、剂量和/或给药方案确保患者将产生对抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体有反应性的抗体的可能性最小。

[0039] 患者可已对用免疫调节剂、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)拮抗剂中的至少一个或其组合进行的治疗缺乏足够反应、丧失反应或不耐受。

[0040] 炎性肠病可为克罗恩氏病(Crohn's disease)或溃疡性结肠炎。炎性肠病可为中度至重度活动性溃疡性结肠炎。

[0041] 给药方案可使得罹患中度至重度活动性溃疡性结肠炎的患者们的粘膜愈合。

[0042] 患者可能先前已接受用至少一种用于炎性肠病的皮质类固醇治疗。患者可同时接受用至少一种用于炎性肠病的皮质类固醇治疗。给药方案可使得患者的皮质类固醇使用减少、消除或减少以及消除。

[0043] 在一些方面,以约1.0mg/m至约1.4mg/ml之间的浓度以某一最终剂型施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段。可以约1.2mg/ml的某一最终剂型施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段。

[0044] 在一些方面,以抗 α 4 β 7抗体的量在约70mg至约250mg之间、在约90mg至约200mg之间、在约150mg至约180mg之间或为至少160mg的某一最终剂型施用人源化免疫球蛋白或抗原结合片段。

[0045] 在一些方面,给药方案不改变接受所述治疗的患者的脑脊髓液中的CD4与CD8的比率。

[0046] 患者可为65岁或65岁以上人士且不需要对给药方案进行任何调整。

[0047] 在一些方面,用抗 α 4 β 7抗体制剂的治疗方法、剂量或给药方案可使抗 α 4 β 7抗体的免疫原性减至最小。

[0048] 附图简述

[0049] 图1是对编码人源化抗 α 4 β 7免疫球蛋白的重链的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)和重链的推导氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的说明。核苷酸序列在重链的5'端处含有克隆位点(小写)、Kozak序列(大写,SEQ ID NO:1的核苷酸18-23)和前导序列(小写,SEQ ID NO:1的核苷酸24-86)。核苷酸序列的开放阅读框架是SEQ ID NO:1的核苷酸24-1433。

[0050] 图2是对编码在本文中称为维多珠单抗的人源化免疫球蛋白的轻链的核苷酸序列(SEQ ID NO:3)和轻链的推导氨基酸序列(SEQ ID NO:4)的说明。核苷酸序列在重链的5'端处含有克隆位点(小写)、Kozak序列(大写,SEQ ID NO:3的核苷酸18-23)和前导序列(小写,SEQ ID NO:3的核苷酸24-80)。核苷酸序列的开放阅读框架是SEQ ID NO:3的核苷酸24-737。

[0051] 图3是(A)在本文中称为维多珠单抗的人源化免疫球蛋白的成熟人源化轻链(SEQ ID NO:4的氨基酸20-238)与(B)在本文中称为LDP-02的人源化免疫球蛋白的成熟人源化轻链(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列比对。(关于LDP-02,参见W098/06248和Feagan等,N.Eng.J.Med.352:2499-2507(2005)。Feagan等描述LDP-02的临床研究,但在所述文章中,其将LDP-02称为MLN02。)所述比对说明维多珠单抗与LDP-02的轻链氨基酸序列在成熟轻链的位置114和115处不同。

[0052] 图4是(A)同属人 κ 轻链恒定区(SEQ ID NO:6)与(B)同属鼠类 κ 轻链恒定区(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列比对。氨基酸残基Thr和Val(其存在于成熟维多珠单抗轻链的位置114和115处(SEQ ID NO:4的氨基酸133和134))存在于人 κ 轻链的恒定区中,而氨基酸残基Ala和Asp(其存在于成熟LDP-02轻链(SEQ ID NO:5)的位置114和115处)存在于小鼠 κ 轻链的恒定区中。

[0053] 图5是载体pLKTOK38D(也称为pTOK38MLN02-TV)的图谱,所述载体编码MLN02的人源化重链和人源化轻链,并且适于在CHO细胞中产生维多珠单抗。(参见公开pLKTOK38的美国专利申请公布号2004/0033561A1。pLKTOK38D是pLKTOK38的变体,其中在图谱上指示的限制位点侧接编码轻链可变区的序列。)

[0054] 图6显示由于蛋白质浓度、pH和表面活性剂:蛋白质摩尔比变化所致的SEC聚集体形成斜度(每日百分比)。在6.0至6.5的pH范围下,制剂的聚集体形成类似于聚山梨醇酯80:蛋白质摩尔比在0.7至1.5范围内的聚集体形成。

[0055] 图7是显示在聚山梨醇酯80:蛋白质摩尔比大于1.5下,聚集体形成率随pH增加而增加的图。

[0056] 图8是显示赋形剂对聚集体形成的影响的图。将25mM柠檬酸盐、5mM柠檬酸盐、5mM

EDTA、25mM半胱氨酸或5mM半胱氨酸添加至制剂中。所有三种赋形剂都减少聚集体形成。

[0057] 图9是一组显示在制剂中存在25mM柠檬酸盐下聚集体形成减少以及蛋白质浓度增加与聚集体形成率增加之间的关系的图。

[0058] 图10是显示40℃下CEX物质降解结果的图。数据显示pH变化对CEX降解的影响。

[0059] 图11是显示温度对制剂pH的影响的图。含有组氨酸的制剂的pH随温度而降低,而柠檬酸盐制剂的pH不受温度影响。

[0060] 图12是显示CEX主要亚型在十二个月时间内的百分比的图。pH是6.0-6.2的制剂显示主要亚型比pH是6.3-6.4的制剂少约1%-2%。

[0061] 图13显示一组表明粘度主要受蛋白质浓度和pH影响的图。显示蔗糖、组氨酸和精氨酸添加物对制剂粘度具有轻微影响。

[0062] 图14显示(A)成熟人GM607'CL抗体κ轻链可变区和(B)人21/28'CL重链可变区的氨基酸序列。

[0063] 图15显示预填充注射器中的蛋白质产物的组分。

[0064] 图16A-16B显示(A)蛋白质浓度和(B)粘度对测试的各种注射器的注射力的影响。

[0065] 图17(A)显示初始滑动力随蛋白质浓度和针尺寸的变化。图17(B)显示各注射器制造商和针尺寸的初始滑动力。

[0066] 图18显示维多珠单抗的吸收曲线。所述图显示肌肉和皮下给药的浓度大体上重叠。这些施用途径的吸收曲线不存在明显总体差异。

[0067] 发明详述

[0068] 本发明涉及一种包含抗α4β7抗体的药物制剂。药物制剂可为包含抗氧化剂或螯合剂(例如柠檬酸盐)、抗α4β7抗体和游离氨基酸的混合物。药物制剂可呈固体或液体形式。

[0069] 定义

[0070] 术语“药物制剂”是指一种含有呈使抗体的生物活性有效形式的抗α4β7抗体,并且不含有对将施用制剂的受试者具有不可接受毒性的其它组分的制剂。

[0071] “稳定”制剂为当储存时其中的抗体实质上保持其物理稳定性和/或其化学稳定性和/或其生物活性的制剂。在一个方面,制剂在储存时实质上保持其物理和化学稳定性以及其生物活性。一般基于制剂的预期存放期选择储存期。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本领域中可用且例如综述于Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee编, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 和 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993) 中。稳定性可在选定温度下持续选定时段进行测量。举例而言,液体制剂在约40℃下稳定持续至少约3天、5天、1周、2周、3周、4周、5周或6周。在另一方面,冻干制剂在约40℃下稳定持续至少约2-4周、至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约12个月或至少约18个月。在另一方面,液体和/或冻干制剂在约5℃和/或25℃下稳定持续至少约1个月、至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约12个月、至少约18个月、至少约24个月、至少约30个月或至少约36个月;和/或在约-20℃和/或-70℃下稳定持续至少约1个月、至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约12个月、至少约18个月、至少约24个月、至少约30个月、至少约36个月、至少约42个月或至少约48个月。此外,在一些实施方案中,液体制剂可在冷冻(至例如-80℃)和解冻之后(例如在1、2或3个冷冻和解冻循环之后)稳定。

[0072] 可以多种不同方法定性和/或定量评估液体制剂的稳定性,包括评估二聚体、多聚体和/或聚集体形成(例如使用尺寸排阻色谱法(SEC)、基质辅助激光脱附离子化飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)、分析性超速离心、光散射(光子相关光谱法、动态光散射(DLS)、静态光散射、多角激光光散射(MALLS))、基于流动的显微镜成像、电子阻抗(库尔特(coulter))计数、光遮蔽或其它液体颗粒计数系统、通过测量混浊度和/或通过目视检查);通过使用阳离子交换色谱(CEX)、等电聚焦(IEF)(例如毛细管技术(cIEF))或毛细管带电泳评估电荷非均匀性;氨基端或羧基端序列分析;质谱分析;SDS-PAGE或SEC分析以比较片段化、完整和多聚(即二聚、三聚等)抗体;肽图(例如胰蛋白酶或LYS-C)分析;评估抗体的生物活性或抗原结合功能等。也可以多种不同方法定性和/或定量评估固态制剂的稳定性,所述方法包括直接测试,如通过X射线粉末衍射(XRPD)鉴定晶体结构;使用傅立叶转换红外光谱法(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)评估固态下的抗体结构;以及使用差示扫描热量测定(DSC)测量冻干固体(熔融、玻璃转移等)中的热转移;及间接测试,如通过卡尔费休(Karl Fisher)试测量水分含量例如以外推通过水解所致的化学不稳定性的可能性。不稳定性可包括以下任何一个或多个:聚集(例如非共价可溶性聚集、共价可溶性聚集(例如二硫键重排/混杂)、不溶性聚集)、脱酰胺(例如Asn脱酰胺)、氧化(例如Met氧化)、异构化(例如Asp异构化)、截断/水解/片段化(例如铰链区片段化)、丁二酰亚胺形成、N端延长、C端加工、糖基化差异等。

[0073] “脱酰胺”单克隆抗体是其一个或多个天冬酰胺或谷氨酰胺残基已经衍生化为例如天冬氨酸或异天冬氨酸的单克隆抗体。

[0074] “易经受脱酰胺”的抗体是包含一个或多个已发现有脱酰胺倾向的残基的抗体。

[0075] “易经受氧化”的抗体是包含一个或多个已发现有氧化倾向的残基的抗体。

[0076] “易经受聚集”的抗体是已发现其与其它抗体分子聚集(尤其在冷冻、加热、干燥、复原和/或搅拌时)的抗体。

[0077] “易经受片段化”的抗体是已发现例如在其铰链区处裂解成两个或更多个片段的抗体。

[0078] 就“减少脱酰胺、氧化、聚集或片段化”而言,其旨在指相对于在不同pH下或在不同缓冲剂中配制的单克隆抗体,防止脱酰胺、聚集或片段化或减少脱酰胺、聚集或片段化的量(例如至80%、60%、50%、40%、30%、20%或10%)。

[0079] “聚集体”、“SEC聚集体”或“可溶性聚集体”大于一个且小于或等于十个通过共价、离子或疏水性相互作用缔合在一起以形成更大蛋白质体的抗体蛋白质和/或片段。

[0080] “不溶性聚集体”或“颗粒”大于十个通过共价、离子或疏水性相互作用缔合在一起以形成更大蛋白质体的抗体蛋白质和/或片段。

[0081] 如本文所用,单克隆抗体的“生物活性”是指抗体能够结合于抗原且产生可在体外或在体内测量的可测量生物反应。所述活性可为拮抗性或促效性。

[0082] 细胞表面分子“ $\alpha 4\beta 7$ 整合素”或“ $\alpha 4\beta 7$ ”是 $\alpha 4$ 链(CD49D, ITGA4)与 $\beta 7$ 链(ITGB7)的杂二聚体。各链可与替代性整合素链形成杂二聚体以形成例如 $\alpha 4\beta 1$ 或 $\alpha E\beta 7$ 。人 $\alpha 4$ 及 $\beta 7$ 基因(分别为GenBank(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) RefSeq寄存编号NM_000885和NM_000889)由B和T淋巴细胞、特别是记忆CD4+淋巴细胞表达。作为许多整合素的典型, $\alpha 4\beta 7$ 可以静止或活化状态存在。 $\alpha 4\beta 7$ 的配体包括血管细胞粘着分子(VCAM)、纤

维结合蛋白 (fibronectin) 和粘膜地址素 (MAdCAM, 例如MAdCAM-1)。

[0083] 如本文所用,“对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性”的人免疫球蛋白或其抗原结合片段结合于 $\alpha 4\beta 7$,但不结合于 $\alpha 4\beta 1$ 或 $\alpha EB7$ 。

[0084] 如本文所用,“等张”制剂具有与人血液实质上相同的渗透压。等张制剂将通常具有约250mOsm至350mOsm的渗透压。可使用例如蒸气压或冰冻型渗压计来测量等张性。

[0085] 如本文所用,“缓冲剂”是指通过其酸碱共轭组分的作用抵抗pH变化的缓冲剂。缓冲剂可存在于本发明的液体或固体制剂中。在一些实施方案中,本发明的缓冲剂将制剂的pH调节至约5.0至约7.5、约pH5.5至约7.5、约pH6.0至约7.0或pH约6.3至约6.5。在一个方面,将控制pH在5.0至7.5范围内的呈单独或组合形式的缓冲剂的实例包括乙酸盐、丁二酸盐、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐、磷酸盐、顺丁烯二酸盐、二甲基胂酸盐、2-[N-吗啉基]乙烷磺酸(MES)、双(2-羟乙基)亚氨基三[羟甲基]甲烷(Bis-Tris)、N-[2-乙酰胺基]-2-亚氨基二乙酸(ADA)、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。在另一方面,本文中的缓冲剂是组氨酸或柠檬酸盐。

[0086] “组氨酸缓冲液”是包含组氨酸离子的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸氯化物、组氨酸乙酸盐、组氨酸磷酸盐、组氨酸硫酸盐溶液。组氨酸缓冲液或组氨酸盐酸盐缓冲液的pH在约pH5.5至约7.0之间、在约pH6.1至约6.9之间或为约pH6.5。

[0087] “柠檬酸盐缓冲液”是包含柠檬酸根离子的缓冲剂。柠檬酸盐缓冲液的实例包括柠檬酸钠、柠檬酸铵、柠檬酸钙和柠檬酸钾溶液。柠檬酸盐缓冲液的pH为约3.0至6.2、约pH5.5至6.5、约pH6.1至约6.5、约pH6.1、约pH6.2或约pH6.5。

[0088] 在本文中,“糖”是具有通式 $(CH_2O)_n$ 的化合物及其衍生物,包括单糖、双糖、三糖、多糖、糖醇、还原糖、非还原糖等。本文中的糖的实例包括葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麦芽糖、聚葡萄糖、赤藻糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇(sylit01)、山梨糖醇、甘露糖醇、蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、麦芽糖、乳糖、麦芽酮糖、葡萄糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、异麦芽酮糖等。糖可为冻干保护剂。在一个方面,本文中的糖是非还原双糖,如蔗糖。

[0089] 在本文中,“表面活性剂”是指降低液体表面张力的试剂。在一个方面,表面活性剂是非离子表面活性剂。本文中的表面活性剂的实例包括聚山梨醇酯(聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯,例如聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80);TRITON(叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇,非离子清洁剂,Dow Chemical Co.,Midland MI的Union Carbide子公司);十二烷基硫酸钠(SDS);月桂硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基磺基甜菜碱、肉豆蔻基磺基甜菜碱、亚油烯基(linoleyl)磺基甜菜碱或硬脂酰基磺基甜菜碱;月桂基肌氨酸、肉豆蔻基肌氨酸、亚油烯基肌氨酸或硬脂酰基肌氨酸;亚油烯基甜菜碱、肉豆蔻基甜菜碱或鲸蜡基甜菜碱;月桂酰胺丙基甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱、亚油酰胺丙基甜菜碱、肉豆蔻酰胺丙基甜菜碱、棕榈酰胺丙基(palimidopropyl)甜菜碱或异硬脂酰胺丙基甜菜碱(例如月桂酰胺丙基甜菜碱);肉豆蔻酰胺丙基二甲胺、棕榈酰胺丙基二甲胺或异硬脂酰胺丙基二甲胺;甲基椰油酰基牛磺酸钠或甲基油烯基牛磺酸二钠;脱水山梨糖醇单棕榈酸酯;以及MONAQUAT系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.);聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)和聚氧乙烯与聚氧丙烯二醇的共聚物(例如泊洛尼克(Pluronic)/泊洛沙姆、PF68等);等。在另一方面,本文中的表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0090] 术语“螯合剂”是指通过一个以上键与原子结合的试剂。在一个方面,本文中的螯

合剂的实例包括柠檬酸盐、乙二胺四乙酸、乙二醇四乙酸(EGTA)、二巯基丙醇、二乙三胺五乙酸和N,N-双(羧甲基)甘氨酸。在另一方面,螯合剂是柠檬酸盐或EDTA。

[0091] 术语“抗氧化剂”是指抑制其它分子氧化的试剂。本文中的抗氧化剂的实例包括柠檬酸盐、硫辛酸、尿酸、谷胱甘肽、生育酚、胡萝卜素、西红柿红素、半胱氨酸、磷酸酯化合物(例如依替膦酸(etidronic acid))、去铁胺和苹果酸盐。

[0092] 本文中的术语“抗体”以最广泛意义使用且明确涵盖全长单克隆抗体、免疫球蛋白、多克隆抗体、由至少两种例如各自针对不同抗原或表位的全长抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)以及个别抗原结合片段(包括dAb、scFv、Fab、F(ab)[']₂、Fab'),包括人、人源化和来自非人物种及重组抗原结合形式的抗体,如微型单功能抗体(monobody)和微型双功能抗体。

[0093] 根据设想抗体的近似分子量为约150,000道尔顿(dalton)来计算本文所述的抗α4β7抗体与其它赋形剂的摩尔量和摩尔比。实际抗体分子量可不为150,000道尔顿,视氨基酸组成或翻译后修饰(例如如取决于用于表达抗体的细胞系)而定。实际抗体分子量可为150,000道尔顿的+/-5%。

[0094] 术语“人抗体”包括具有源于人生殖系免疫球蛋白序列的序列的抗体,如源于具有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠(例如XENOMOUSE基因工程改造小鼠(Abgenix, Fremont, CA)、HUMAB-MOUSE®、KIRIN TC MOUSE™转染色体小鼠、KMMOUSE®(MEDAREX, Princeton, NJ))、人噬菌体显示库、人骨髓瘤细胞或人B细胞的抗体。

[0095] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指由实质上均质抗体的群体获得的抗体,即除可在产生单克隆抗体期间出现的可能变体(所述变体一般以少量存在)之外,构成所述群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,各单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。修饰语“单克隆”指示抗体是从实质上均质的抗体群体获得的特生,并且不应解释为需要通过任何特定方法来产生所述抗体。举例而言,将要根据本发明使用的单克隆抗体可通过最初由Kohler等, Nature, 256:495 (1975)描述的杂交瘤方法制备,或可通过重组DNA方法(参见例如美国专利号4,816,567)制备。“单克隆抗体”也可使用例如Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991) 和Marks等, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) 中描述的技术从噬菌体抗体库分离。

[0096] 本文中的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体,其中一部分重链和/或轻链与源于特定物种或属于特定抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源,而所述链的剩余部分与源于另一物种或属于另一抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源;以及所述抗体的片段,只要其展现所需生物活性即可(美国专利号4,816,567;和Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))。本文中的相关嵌合抗体包括包含源于非人灵长类动物(例如旧世界猴(Old World Monkey)、猿(Ape)等)的可变域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体。

[0097] 在本发明的制剂中的所制备人源化免疫球蛋白的“抗原结合片段”至少包含抗α4β7抗体的重链和/或轻链的可变区。举例而言,维多珠单抗的抗原结合片段包含人源化轻链序列SEQ ID NO:4的氨基酸残基20至131。所述抗原结合片段的实例包括在本领域中已知的人源化免疫球蛋白的Fab片段、Fab'片段、scFv和F(ab')₂片段。本发明的人源化免疫球蛋白的抗原结合片段可通过酶促裂解或通过重组技术来产生。举例而言,木瓜蛋白酶或胃蛋白

酶裂解可分别用于产生Fab或F(ab')₂片段。抗体也可使用已将一个或多个终止密码子引入天然终止位点上游的抗体基因以多种截短形式产生。举例而言,编码F(ab')₂片段的重链的重组构建体可经设计以包括编码重链的CH₁结构域和铰链区的DNA序列。在一个方面,抗原结合片段抑制 α 4 β 7整合素结合于其一个或多个配体(例如粘膜地址素MAdCAM(例如MAdCAM-1)、纤维结合蛋白)。

[0098] 木瓜蛋白酶消化抗体会产生两个称为“Fab”片段的相同抗原结合片段,各自具有单一抗原结合位点;以及一个剩余“Fc”片段,其名称反映其能够易于结晶。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

[0099] “Fv”是由一个重链可变域和一个轻链可变域呈非共价缔合形式的二聚体组成的抗体片段。

[0100] Fab片段也含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH₁)。Fab'片段因在重链CH₁结构域的羧基端添加少量残基(包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸)而不同于Fab片段。Fab'-SH在本文中表示恒定域的半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的Fab'。F(ab')₂抗体片段最初以之间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对形式产生。也已知抗体片段的其它化学偶联。

[0101] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一个方面,Fv多肽进一步在V_H结构域与V_L结构域之间包含使得scFv能够形成抗原结合所需的结构的连接子。关于scFv的综述,参见Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg和Moore编, Springer-Vedag, New York, 第269页至第315页(1994)。

[0102] 术语“微型双功能抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含与同一多肽链(V_H-V_L)中的可变轻域(V_L)连接的可变重域(V_H)。通过使用过短而无法使同一链上两个结构域之间配对的连接子,迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对且产生两个抗原结合位点。微型双功能抗体更充分描述于例如EP404,097;W093/11161;和Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)中。

[0103] “全长抗体”是包含抗原结合可变区以及轻链恒定域(C_L)和重链恒定域CH₁、CH₂及CH₃的抗体。恒定域可为天然序列恒定域(例如人天然序列恒定域)或其氨基酸序列变体。在一个方面,全长抗体具有一种或多种效应功能。

[0104] 本文中的“氨基酸序列变异”抗体是具有不同于主要种类抗体的氨基酸序列的抗体。通常,氨基酸序列变体将与主要种类抗体具有至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性。氨基酸序列变体在主要种类抗体的氨基酸序列内或邻近于主要种类抗体的氨基酸序列的某些位置处具有取代、缺失和/或添加,但仍保留抗原结合活性。抗体的恒定区序列的变异对抗原结合活性的影响将比可变区的变异小。在可变区中,氨基酸序列变体将与主要种类抗体至少约90%同源、至少约95%同源、至少约97%同源、至少约98%同源或至少约99%同源。

[0105] “同源性”定义为在对准序列且必要时引入间隙以实现最大同源性百分比之后,在氨基酸序列变体中的相同残基的百分比。用于比对的方法和计算机程序在本领域中是众所周知的。

[0106] “治疗性单克隆抗体”是用于人受试者疗法的抗体。本文中公开的治疗性单克隆

抗体包括抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。

[0107] 本文中的“糖基化变异”抗体是附接有一个或多个不同于一个或多个附接于主要种类抗体的碳水化合物部分的碳水化合物部分的抗体。本文中的糖基化变体的实例包括有G1或G2寡糖结构而非G0寡糖结构附接于其Fc区的抗体,有一或两种碳水化合物部分附接于其一个或两个轻链的抗体;无碳水化合物附接于抗体的一个或两个重链的抗体等;及糖基化变化的组合。

[0108] 抗体“效应功能”是指可归因于抗体Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变异Fc区)的那些生物活性。抗体效应功能的实例包括:C1q结合;补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等。

[0109] 视全长抗体的重链的恒定域的氨基酸序列而定,可将全长抗体指定为不同“类别”。存在五种主要类别的全长抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的若干种可进一步细分为“子类”(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于抗体的不同类别的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是众所周知的。

[0110] 来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”可基于其恒定域的氨基酸序列指定为两种明显不同类型(称为 κ 及 λ)中的一个。

[0111] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀手(Natural Killer, NK)细胞、嗜中性白细胞和巨噬细胞)识别目标细胞上的结合抗体且随后导致目标细胞溶解。用于介导ADCC的原代细胞(NK细胞)仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。FcR在造血细胞上的表达概述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991) 的第464页上的表3中。为了评估相关分子的ADCC活性,可进行体外ADCC测定,如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述的测定。适用于所述测定的效应细胞包括外周血液单核细胞(PBMC)和天然杀手(NK)细胞。或者或另外,可例如在如Clynes等, *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998) 中公开的动物模型中体内评估相关分子的ADCC活性。

[0112] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述结合于抗体Fc区的受体。在一个方面,FcR是天然序列人FcR。在另一方面,FcR为结合IgG抗体的受体(γ 受体)且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII子类的受体,包括这些受体的对偶基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(抑制受体),所述受体具有主要在其细胞质域方面不同的类似氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其细胞质域中含有免疫受体酪氨酸基活化基元(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其细胞质域中含有免疫受体酪氨酸基抑制基元(ITIM)。(参见M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997) 中的综述)。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel等, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 以及de Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:33-41 (1995) 中。本文中的术语“FcR”涵盖其它FcR,包括将来待鉴定的FcR。所述术语也包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 及Kim等, *J. Immunol.* 154:249 (1994))。

[0113] 术语“高变区”当在本文中使用时是指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变域中的残基24-34(L1)、

50-56 (L2) 和89-97 (L3) 以及重链可变域中的31-35 (H1)、50-65 (H2) 和95-102 (H3);Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)) 和/或来自“高变环”的那些残基(例如轻链可变域中的残基26-32 (L1)、50-52 (L2) 和91-96 (L3) 以及重链可变域中的26-32 (H1)、53-55 (H2) 和96-101 (H3);Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917 (1987))。“框架区”或“FR”残基是除如本文定义的高变区残基外的那些可变域残基。可将高变区或其CDR从一个抗体链转移至另一抗体链或至另一蛋白质以赋予所得(复合)抗体或结合蛋白以抗原结合特异性。

[0114] “人源化”形式的非人(例如啮齿动物)抗体是含有源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。人源化抗体大部分是人免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者的高变区的残基经来自如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的非人物种(供体抗体)的高变区的具有所需特异性、亲和力和能力的残基置换。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基由相应非人残基置换。此外,人源化抗体可包含未见于接受者抗体或供体抗体中的残基。进行这些修饰以进一步提高抗体效能。一般而言,人源化抗体将包含实质上所有至少一个且通常两个可变域,其中所有或实质上所有高变环都对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且所有或实质上所有FR都是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。更多细节参见Jones等,Nature321:522-525 (1986);Riechmann等,Nature332:323-329 (1988);以及Presta,Curr.op.Struct.Biol.2:593-596 (1992)。

[0115] “亲和力成熟”抗体是相较于不具有变化的亲本抗体,在其一个或多个高变区中具有一个或多个导致抗体对抗原的亲和力提高的变化的抗体。在一个方面,亲和力成熟抗体将对目标抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔亲和力。亲和力成熟抗体是通过本领域中已知的程序制备。Marks等,Bio/Technology10:779-783 (1992) 描述通过VH和VL结构域改组实现亲和力成熟。对CDR和/或框架残基的随机突变诱发由以下文献描述:Barbas等,Proc Natl.Acad.Sci,USA91:3809-3813 (1994);Schier等,Gene169:147-155 (1995);Yelton等,J.Immunol.155:1994-2004 (1995);Jackson等,J.Immunol.154 (7):3310-9 (1995);以及Hawkins等,J.Mol.Biol.226:889-896 (1992)。

[0116] “分离的”抗体是已经鉴定且与其天然环境的组分分离和/或自其天然环境的组分回收的抗体。在某些实施方案中,抗体将:(1) 被纯化至如通过劳立法(Lowry method)所测定大于95重量%蛋白质且或者大于99重量%;(2) 被纯化至足以通过使用旋杯式测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3) 通过使用考马斯蓝(Coomassie blue)或银染色法,在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE被纯化至均质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常将通过至少一个纯化步骤来制备分离的抗体。

[0117] “治疗”是指治疗性治疗与防治性或预防性措施两者。需要治疗者包括已患有疾病者以及要预防疾病或其复发者。因此,本文中待治疗的患者可已诊断为患有疾病或可能易患或易感疾病。术语“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0118] 配制的抗体是实质上纯净的且宜为实质上均质的(即不合污染性蛋白质等)。“实质上纯净”抗体意谓以蛋白质的总重量计,包含至少约90重量%、或者至少约95重量%或97

重量%抗体的组合物。“实质上均质”抗体意谓包含蛋白质的组合物,其中以蛋白质的总重量计,至少约99重量%蛋白质是特定抗体,例如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。

[0119] 如本文关于溃疡性结肠炎受试者所用的“临床缓解”是指完全Mayo计分为2分或小于2分且无个别子计分大于1点。克罗恩氏病“临床缓解”是指CDAI计分为150分或小于150分。

[0120] 如本文关于溃疡性结肠炎受试者所用的“临床反应”是指完全Mayo计分降低3分或3分以上及从基线降低30% (或如果在随访时未进行完全Mayo计分,则部分Mayo计分降低2分或2分以上及从基线降低25%或25%以上),伴有直肠出血子计分降低1分或1分以上或绝对直肠出血计分降低1分或1分以下。如本文关于克罗恩氏病受试者所用的“临床反应”是指CDAI计分从基线(第0周)降低70分或70分以上。

[0121] 如本文关于溃疡性结肠炎受试者所用的“粘膜愈合”是指内窥镜子计分为1分或1分以下。

[0122] 如本文所用,“治疗失败”是指疾病恶化、需要急救药物或手术介入来治疗溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。急救药物是为治疗新型或未分型溃疡性结肠炎或克罗恩氏病症状所需的任何新颖药物或基线药物剂量的任何增加(除用于控制慢性腹泻的止泻药以外)。

[0123] 制剂

[0124] 如本文所述,已发现抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体在与抗氧化剂或螯合剂一起配制时更稳定。此外,如本文所述,可配制抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体以减少聚集体形成(例如可减少制剂中的聚山梨醇酯80的量)。举例而言,包含柠檬酸盐或EDTA和抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的制剂在储存期间降低抗体聚集体形成率。也可在无氧气情况下储存制剂以减少聚集体形成。在一个实施方案中,制剂在25℃下12个月之后具有小于约2.5%的抗体聚集体形成。在一个实施方案中,制剂在25℃下12个月之后具有小于约2.0%的抗体聚集体形成。在一个实施方案中,制剂在25℃下12个月之后具有小于约1.6%的抗体聚集体形成。在一个实施方案中,制剂在25℃下12个月之后具有小于约1.3%的抗体聚集体形成。在一个实施方案中,制剂在25℃下12个月之后具有小于约1.0%的抗体聚集体形成。在另一个实施方案中,制剂在5℃下12个月之后具有小于约0.5%的抗体聚集体形成。在另一个实施方案中,制剂在5℃下12个月之后具有小于约0.3%的抗体聚集体形成。

[0125] 在第一方面,本发明提供一种稳定抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂。制剂包含抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体和抗氧化剂或螯合剂。制剂也包含可为一种或多种游离氨基酸的缓冲剂。制剂可任选进一步包含表面活性剂。制剂中的抗体可为全长抗体或其抗原结合片段,如Fab、Fv、scFv、Fab'或F(ab')₂片段。

[0126] 可通过从制剂移除氧气来减少聚集体形成。或者,制剂可含有抗氧化剂或螯合剂。在一个方面,可包括于制剂中的示例性抗氧化剂和螯合剂包括硫辛酸、尿酸、谷胱甘肽、生育酚、胡萝卜素、西红柿红素、半胱氨酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、二巯基丙醇、二乙三胺五乙酸和N,N-双(羧甲基)甘氨酸、膦酸酯化合物(例如依替膦酸)、去铁胺、苹果酸盐以及柠檬酸盐。一些抗氧化剂和螯合剂可在制剂储存期间降低聚集体形成率。在另一方面,螯合剂和/或抗氧化剂是柠檬酸盐或EDTA。液体制剂的示例性螯合剂浓度在约大于0mM至约60mM、约5mM至约50mM、约5mM至约15mM、约10mM至约25mM及约20mM至约30mM范围内。在另一方面,螯合剂浓度是约0mM至约30mM。在一个实施方案中,螯合剂和/或抗氧化剂

是柠檬酸盐,并且柠檬酸盐浓度是约0mM至约15mM、约0mM至约10mM或约0mM至约5mM。

[0127] 制剂可含有任何一种所需游离氨基酸,其可呈L型、D型或这些形式的任何所需混合物。在一个方面,可包括于制剂中的游离氨基酸包括例如组氨酸、丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、丝氨酸、赖氨酸、色氨酸、缬氨酸、半胱氨酸以及其组合。一些氨基酸可例如通过氢键、盐桥、抗氧化性质或疏水性相互作用或通过从蛋白质表面排除而在制造、干燥、冻干和/或储存期间稳定化蛋白质免遭降解。氨基酸可充当张力调节剂或可用于降低制剂粘度。在另一方面,游离氨基酸(如组氨酸和精氨酸)可充当冻干保护剂,并且当冻干为制剂的组分时不结晶。单独或呈组合形式的游离氨基酸(如谷氨酸和组氨酸)可无当pH在5至7.5范围内的水溶液中的缓冲剂。在另一方面,制剂含有组氨酸、精氨酸或组氨酸与精氨酸的组合。在另一方面,液体制剂的游离氨基酸浓度在约9mM至约0.5M范围内,例如为约10mM至约90mM、约10mM至约75mM、约10mM至约40mM、约25mM至约50mM、约15mM至约300mM、约20mM至约200mM、约25mM至约150mM、约50mM至约75mM、约50mM至约120mM、约50mM至约150mM或约50mM或约125mM。

[0128] 制剂可任选进一步含有至少一种表面活性剂例如以控制可溶性和不溶性聚集体形成。在一个方面,表面活性剂是非离子表面活性剂。在另一方面,表面活性剂是离子型表面活性剂。可包括于制剂中的示例性表面活性剂包括例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆(泊洛尼克®)以及其组合。当存在时,表面活性剂通常以减少在聚硅氧、填充小瓶、预填充注射器和/或药筒存在下例如在装瓶、冷冻、干燥、冻干和/或复原期间不溶性抗体聚集体形成的量包括在内。表面活性剂浓度通常是约0.0001%至约1.0%、约0.01%至约0.5%,例如是约0.05%、0.1%、0.15%、0.20%、0.3%、0.4%或0.5%(w/v)。较高浓度的表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)可导致更多SEC聚集体形成。降低聚山梨醇酯80的浓度可减少在储存时SEC聚集体的形成。在一个方面,表面活性剂:抗体摩尔比是约0.7:1至约2.0:1。在另一方面,表面活性剂:抗体摩尔比是1.5:1。

[0129] 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的一个实施方案含有高浓度抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。举例而言,在一个实施方案中,液体制剂可包含至少约60mg/ml、至少约70mg/ml、至少约80mg/ml、至少约90mg/ml、至少约100mg/ml、至少约110mg/ml、至少约120mg/ml、至少约130mg/ml、至少约140mg/ml、至少约150mg/ml、至少约160mg/ml、至少约170mg/ml、至少约180mg/ml、至少约190mg/ml、至少约200mg/ml、至少约250mg/ml、至少约300mg/ml、约60mg/ml至约190mg/ml、约60mg/ml至约170mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、约150mg/ml至约180mg/ml或约160mg/ml或约165mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。或者,在另一方面,液体制剂可包含至少约154mg/ml、至少约176mg/ml。

[0130] 制剂可为液体或固体。液体制剂是在适合水性溶剂(如水)或水性/有机混合物(如水醇混合物)中制备的水溶液或悬浮液。液体制剂的pH介于约5.5与约7.5之间、约6.0与7.3之间、约6.0与约7.0之间、约6.0与6.5之间、约6.0与6.3之间、约6.3与7.1之间或约6.4与7.0之间或6.3与6.8之间,如为约6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8或6.9。液体制剂可保持于室温下、冷藏(例如2℃至8℃)或冷冻(例如-20℃或-70℃)以实现储存。

[0131] 固体制剂可例如在添加冻干保护剂的情况下以任何适合方法制备且可呈例如饼或粉末形式。在一个方面,通过干燥如本文所述的液体制剂(例如通过冻干或喷雾干燥)来制备固体制剂。当制剂为固体制剂时,制剂的水分含量可不超过约5%、不超过约4.5%、不超过约4%、不超过约3.5%、不超过约3%、不超过约2.5%、不超过约2%、不超过约1.5%、

不超过约1%，或为实质上无水的。可将固体制剂溶解（即复原）于适合介质或溶剂中以变为适于施用的液体。适用于复原固体制剂的溶剂包括水、等张生理食盐水、缓冲液（例如磷酸盐缓冲生理食盐水）、林格氏（Ringer's）（乳酸盐或右旋糖）溶液、最低必需培养基、醇/水溶液、右旋糖溶液等。溶剂的量可导致治疗性蛋白质浓度与干燥前浓度相比更高、相同或更低。在另一方面，复原的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体浓度与干燥前液体制剂中的浓度相同。

[0132] 制剂可为无菌的，并且这可在制备制剂之前或之后根据本领域技术人员已知用于产生适于向人受试者施用的无菌药物制剂的程序来实现。制剂可例如在干燥之前和/或复原之后，通过经小孔隙过滤、通过无菌处理或通过暴露于紫外辐射以液体形式来灭菌。过滤器孔隙尺寸可为0.1 μm 或0.2 μm 以过滤微生物或为10nm至20nm以过滤病毒颗粒。或者或另外，干燥制剂可例如通过暴露于 γ 辐射来灭菌。在一个方面，抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体液体制剂是通过在干燥之前过滤来灭菌。

[0133] 在一个方面，制剂在储存时是稳定的。各种稳定性测定可为熟练从业者用于证实制剂的稳定性。举例而言，液体制剂中的抗体当储存于约25 $^{\circ}\text{C}$ 下时可稳定至少约4周、至少约2个月、至少约3个月或至少约6个月或至少约9个月或至少约12个月；在约2 $^{\circ}\text{C}$ 至8 $^{\circ}\text{C}$ 下稳定至少约3个月、至少约1年、至少约2年、至少约3年或3年以上。或者或此外，制剂中的抗体当储存于约15 $^{\circ}\text{C}$ 下时可稳定至少约4周、至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约1年或1年以上。或者或此外，制剂中的抗体当储存于约-20 $^{\circ}\text{C}$ 或-70 $^{\circ}\text{C}$ 下时可稳定至少约4周、至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约1年、至少约2年、至少约3年、至少约4年或4年以上。

[0134] 可通过评估制剂中的抗体在配制时以及在指示温度下储存之后的物理稳定性、化学稳定性和/或生物活性来测试稳定性。可以多种不同方法定性和/或定量评估液体制剂或复原干燥粉末的物理和/或化学稳定性（参见例如Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development, Rodriguez-Diaz等编, Informa Healthcare (2005)），包括评估可溶性和不溶性聚集体形成（例如使用尺寸排阻色谱法、分析性超速离心、MALDI-TOF MS、光散射（动态（DLS）或MALLS）、基于流动的显微镜成像或其它液体颗粒计数系统、通过测量混浊度、通过密度梯度离心和/或通过目视检查）；通过使用阳离子交换色谱（也参见Vlasak和Ionescu, Curr. Pharm. Biotechnol. 9: 468-481 (2008) 以及Harris等, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 752: 233-245 (2001)）、等电聚焦或毛细管带电泳评估电荷非均匀性；氨基端或羧基端序列分析；质谱分析；SDS-PAGE分析以比较片段化、完整和多聚（即二聚、三聚等）抗体；肽图（例如胰蛋白酶或LYS-等）。不稳定性可导致聚集、脱酰胺（例如Asn脱酰胺）、氧化（例如Met氧化）、异构化（例如Asp异构化）、变性、剪短/水解/片段化（例如铰链区片段化）、丁二酰亚胺形成、不成对半胱氨酸、N端延长、C端加工、糖基化差异等。可使用熟练从业者可用的多种技术来评估生物活性或抗原结合功能（例如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体与MAdCAM（例如MAdCAM-1）的结合或抑制表达 $\alpha 4\beta 7$ 整合素的细胞与MAdCAM（例如MAdCAM-1）（例如固定MAdCAM（例如MAdCAM-1））的结合）（参见例如Soler等, J. Pharmacol. Exper. Ther. 330: 864-875 (2009)）。测量干燥制剂的水分含量可指示制剂将经受化学或物理降解的可能性，水分含量越高，降解越多。

[0135] 稳定制剂可促成抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的低免疫原性。免疫原性抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可导致人受试者或患者的人抗人抗体（HAHA）反应。对抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体显现HAHA反应的患者在治疗时可具有不利

事件(例如部位输注反应)或可快速消除抗 α 4 β 7抗体,从而导致剂量低于治疗所计划的剂量。对抗 α 4 β 7抗体治疗的早期研究的报道(Feagen等(2005) N.Engl. J. Med. 352:2499-2507)指示截至第8周在44%治疗患者中产生人抗人抗体。此研究中的抗体是以液体形式储存且不含有任何聚山梨醇酯。

[0136] 在一些实施方案中,相较于稳定性较小的制剂的HAHA结果,制剂可使HAHA阴性患者的比例增加至患者的至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0137] 在一些实施方案中,抗 α 4 β 7抗体制剂具有 $\geq 50\%$ 主要带电荷亚型、 $\geq 55\%$ 主要带电荷亚型或65%至70%主要带电荷亚型。在其它方面,稳定抗 α 4 β 7抗体制剂具有 $\leq 45\%$ 酸性带电荷亚型、 $\leq 40\%$ 酸性带电荷亚型、 $\leq 30\%$ 酸性带电荷亚型或22%至28%酸性亚型。在其它方面,稳定抗 α 4 β 7抗体制剂具有 $\leq 25\%$ 碱性亚型、 $\leq 20\%$ 碱性亚型、 $\leq 15\%$ 碱性亚型、约5%碱性亚型或约10%碱性亚型。在一个方面,例如如通过CEX所测定,稳定抗 α 4 β 7抗体制剂具有 $\geq 55\%$ 主要亚型、 $\leq 30\%$ 酸性亚型和/或 $\leq 20\%$ 碱性亚型。在另一方面,例如如通过cIEF所测定,稳定抗 α 4 β 7抗体制剂具有 $\geq 50\%$ 主要亚型、 $\leq 45\%$ 酸性亚型和/或 $\leq 10\%$ 碱性亚型。

[0138] 在一些方面,抗 α 4 β 7抗体干燥固体制剂具有 $\leq 10\%$ 水分含量、 $\leq 5\%$ 水分含量或 $< 2.5\%$ 水分含量。复原所需时间 ≤ 60 分钟、 ≤ 50 分钟或 ≤ 40 分钟或 ≤ 30 分钟或 ≤ 20 分钟。

[0139] 可通过SEC、分析性超速离心、光散射(DLS或MALLS)、MALDI-TOF MS或纳米尺寸测量(如纳米粒子径迹分析NTA, NanoSight Ltd, Wiltshire, UK)来测量即液体制剂或复原制剂中的单体含量和/或聚集体含量(例如呈二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、寡聚物和更高级聚集体形式)。可以许多方法实现聚集体的解析、表征和定量,所述方法包括例如通过较长管柱或通过连续附接第二或更多SEC管柱与初始分析SEC管柱串联来增加SEC管柱分离的长度;用光散射补充SEC对单体的定量;或通过使用NTA。

[0140] 在一个实施方案中,抗 α 4 β 7抗体制剂具有 $\geq 90\%$ 单体抗体、 $\geq 95\%$ 单体抗体或97%至99%单体抗体。在另一个实施方案中,抗 α 4 β 7抗体制剂中的大部分物质的平均半径 $\leq 20\text{nm}$ 、 $\leq 15\text{nm}$ 、 $\leq 10\text{nm}$,或为约5nm至约7nm。在一个方面,根据蛋白质分析,抗 α 4 β 7抗体制剂具有 $\geq 80\%$ 量的重链加轻链。在一个方面,存在 $\geq 90\%$ 重链加轻链。在另一方面,抗 α 4 β 7抗体制剂具有 $\leq 10\%$ 聚集体、 $\leq 5\%$ 聚集体、 $\leq 2.5\%$ 聚集体、 $\leq 1.5\%$ 聚集体、 $\leq 1.0\%$ 聚集体或 $\leq 0.5\%$ 聚集体。在另一方面,稳定抗 α 4 β 7抗体制剂具有 $\geq 96\%$ 单体和/或 $\leq 2.5\%$ 聚集体。在另一方面,稳定抗 α 4 β 7抗体制剂具有约99%单体和/或约 $< 1\%$ 聚集体。

[0141] 可通过光遮蔽(例如Hach Ultra Analytics(Grants Pass, OR)的液体颗粒计数系统(HIAC))、显微法、库尔特计数器或基于数字(例如基于流动)显微镜成像的系统(如Brightwell(Ottawa, CA)的微流体(microfluidics)成像(MFI)或Fluid Imaging Technologies(Yarmouth, ME)的FLOWCAM® Image颗粒分析仪)来测量即液体制剂或复原制剂中的聚集体或未溶解赋形剂的例如大于1-2微米的粒度。在一个方面,抗 α 4 β 7抗体制剂中的粒度是约30 μm 、约25 μm 、约10 μm 、约5 μm 、约2 μm 或1 μm 或1 μm 以下。应将抗体制剂中的颗粒的量减至最少。在一个方面,在一个剂量中,抗 α 4 β 7抗体制剂中的颗粒的量是 $\geq 10\mu\text{m}$ 直径 < 6000 个颗粒和/或 $\geq 25\mu\text{m}$ 直径 < 600 个颗粒(美国药典(U.S. Pharmacopoeia)第788章,光遮蔽计数法;一半那些量是通过显微镜定量法测定)。在另一方面,在一个剂量的抗 α 4 β 7抗体制剂中,颗粒的量是 $\geq 10\mu\text{m}$ 约1000个颗粒和 $\geq 25\mu\text{m}$ 约0-100个颗粒(MFI方法)。在另一方

面,例如通过MFI测量,在一个剂量的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂中,每毫升的颗粒量是每毫升约500个至约2000个2-10 μm 颗粒、每毫升约50个至约350个 $\geq 10\mu\text{m}$ 颗粒和每毫升约0个至约50个 $\geq 25\mu\text{m}$ 颗粒。在另一方面,在一个剂量的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂中,颗粒量是每毫升约500个至约100,000个、约1000个至约5000个或约1500个至约3000个2-10 μm 颗粒。

[0142] 可控制抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的粘度以实现皮下或肌肉施用。粘度可受蛋白质浓度和pH影响。举例而言,随着蛋白质浓度升高,粘度可增加。pH升高可使抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的粘度降低。在一些蛋白质制剂中,添加氯化钠以降低制剂粘度。可影响抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂粘度的其它组分是氨基酸,如组氨酸和精氨酸。

[0143] 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂可为等张的(例如250-350mOsm)或高张的(例如大于350mOsm、大于450mOsm、大于550mOsm或大于650mOsm),例如以供皮下或肌肉施用。在一个方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂不为低张的,例如小于250mOsm。在另一方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂是约350mOsm至约400mOsm、约400mOsm至约450mOsm或约350mOsm至约450mOsm。

[0144] 导致变性的不稳定性可通过差示扫描热量测定(DSC)来评估。在DSC中,抗体具有两个熔融温度(T_m),例如 T_{m1} 和 T_{m2} 。某些赋形剂可影响天然抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的稳定性。当通过DSC比较制剂时,熔融温度较高的研究结果可指示 T_m 较高的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂更稳定。举例而言,在pH5.7下,相较于在pH6.5下,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的 T_m 更低,并且因此稳定性较小。在一个方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的 $T_{m1} > 60^\circ\text{C}$ 。在另一方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的 T_{m1} 是约 65°C 至约 70°C 或约 69°C 。在一个方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的 $T_{m2} > 80^\circ\text{C}$ 。在另一方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的 T_{m2} 是约 82°C 至约 88°C 或约 86°C 。

[0145] 在一个实施方案中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的结合亲和力或EC50值是参考标准抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的约60%至约140%。在一个方面,本文所述的制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体以参考标准的约80%至约120%的值结合于例如于细胞上的 $\alpha 4\beta 7$ (W098/06248或美国专利号7,147,851)。在另一个实施方案中,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂能够抑制表达 $\alpha 4\beta 7$ 整合素的细胞与MAdCAM(例如MAdCAM-1)(例如MAdCAM-Ig嵌合体)的结合至少50%或至少60%(参见美国专利申请公布号20070122404,也参考标准实施例)。

[0146] 如上所指示,在本文中明确涵盖将制剂冷冻。因此,可测试制剂在冷冻和解冻时的稳定性。因此,液体制剂中的抗体在冷冻和解冻制剂时可稳定的,例如抗体在一个、两个、三个、四个、五个或五个以上冷冻/解冻循环之后可为稳定的。

[0147] 在一些实施方案中,药物制剂是包含至少约60mg/ml至约170mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、缓冲剂(例如组氨酸)和至少约5mM柠檬酸盐的液体制剂。在其它实施方案中,制剂是包含至少约60mg/ml至约170mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、缓冲剂(例如柠檬酸盐)、氨基酸(例如精氨酸)和表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)的液体制剂。

[0148] 在另一个实施方案中,制剂包含至少约140mg/ml或约150mg/ml至约170mg/ml(例如约160mg/ml)抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、缓冲剂(例如组氨酸)、至少约5mM柠檬酸盐和游离氨基酸(例如精氨酸)。

[0149] 在另一个实施方案中,制剂包含至少约160mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、缓冲剂(例如组氨酸)、至少约5mM柠檬酸盐、0.2%聚山梨醇酯80和游离氨基酸(例如精氨酸)。在一个实施方案中,制剂中的缓冲剂浓度是约15mM至约75mM、约25mM至约65mM或是约50mM。制剂中的游离氨基酸浓度是约50mM至约250mM、约75mM至约200mM、约100mM至约150mM或是约125mM;制剂

中的聚山梨醇酯80浓度是约0.05%至0.4%、约0.1%至0.4%、约0.1%至0.3%、约0.1%至0.25%、约0.1%至0.2%或是约0.2%。

[0150] 在一些实施方案中,制剂是固体制剂(例如冻干制剂),其包含抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体、柠檬酸盐、组氨酸、精氨酸、聚山梨醇酯80和冻干保护剂或糖(如非还原糖)的混合物。糖可以达到0%至20%或约6%至约10%的浓度包括于液体制剂中。

[0151] 在一个实施方案中,将制剂冻干且以单次剂量形式储存于一个容器(例如小瓶、注射器、药筒和/或自动注射器)中。容器可储存于约2-8℃或25℃下直至将其向有需要的受试者施用。小瓶可例如是5cc、10cc或20cc小瓶(例如用于160mg/ml剂量)。小瓶可含有至少约20mg、至少约50mg、至少约70mg、至少约80mg、至少约100mg、至少约120mg、至少约155mg、至少约180mg、至少约200mg、至少约240mg、至少约300mg、至少约360mg、至少约400mg、至少约540mg或至少约900mg抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一个方面,容器含有约165mg抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。

[0152] 在另一个实施方案中,制剂是液体且以单次剂量形式储存于一个或两个小瓶、药筒、注射器或自动注射器中。小瓶、药筒、注射器或自动注射器可储存于约2-8℃下直至向有需要的受试者施用其内含物,例如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。小瓶可例如是5cc、10cc或20cc小瓶(例如用于160mg/ml剂量)。小瓶可含有至少约20mg、至少约50mg、至少约70mg、至少约80mg、至少约100mg、至少约120mg、至少约155mg、至少约180mg、至少约200mg、至少约240mg、至少约300mg、至少约360mg、至少约400mg、至少约540mg或至少约900mg抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。在一个方面,小瓶含有约165mg抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。注射器或药筒可为1mL或2mL容器(例如用于160mg/mL剂量)或大于2mL,例如用于较高剂量(至少320mg或400mg或400mg以上)。注射器或药筒可含有至少约20mg、至少约50mg、至少约70mg、至少约80mg、至少约100mg、至少约120mg、至少约155mg、至少约180mg、至少约200mg、至少约240mg、至少约300mg、至少约360mg、至少约400mg或至少约500mg抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体。

[0153] 一种或多种其它药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(如Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Hendrickson,R.编(2005)中所述者)可包括于制剂中,只要其不会不利影响制剂的所需特征即可。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒且包括其它缓冲剂;共溶剂;抗氧化剂,包括柠檬酸盐和半胱氨酸;螯合剂,如EDTA;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);生物可降解聚合物,如聚酯;防腐剂;出于注射便利的容器壁润滑剂,例如聚硅氧、矿物油、甘油或TRIBOGLIDE®(Tribo Film Research, Inc.)全氟聚醚衍生物;和/或成盐相对离子,如钠。

[0154] $\alpha 4\beta 7$ 抗体

[0155] 适用于制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体包括来自任何所需来源的抗体,如完全人抗体、鼠类抗体、兔抗体等;及任何所需工程改造抗体,如嵌合抗体、人源化抗体等。这些类型抗体的任一个的抗原结合片段(如Fab、Fv、scFv、Fab'和F(ab')₂片段)也适用于制剂中。

[0156] 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可结合于 $\alpha 4$ 链(例如人源化MAb21.6(Bendig等,美国专利号5,840,299))、 $\beta 7$ 链(例如FIB504或人源化衍生物(例如Fong等,美国专利号7,528,236))上的表位,或结合于由 $\alpha 4$ 链与 $\beta 7$ 链缔合所形成的组合表位。在一个方面,抗体结合 $\alpha 4\beta 7$ 复合物上的组合表位,但不结合 $\alpha 4$ 链或 $\beta 7$ 链上的表位,除非所述链彼此缔合。 $\alpha 4$ 整合素与 $\beta 7$ 整合素的缔合可例如通过引入存在于一起构成表位的两个链上的邻近残基或通过构象暴露一个链(例如 $\alpha 4$ 整合素链或 $\beta 7$ 整合素链)上的在不存在适当整合素搭配物或不存在整合素活化下不可实

现抗体结合的表位结合位点来产生组合表位。在另一方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体结合 $\alpha 4$ 整合素链与 $\beta 7$ 整合素链两者,并且因此对于 $\alpha 4\beta 7$ 整合素复合物具有特异性。所述抗体可例如结合 $\alpha 4\beta 7$ 但不结合 $\alpha 4\beta 1$ 且/或不结合 $\alpha \epsilon \beta 7$ 。在另一方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体与Act-1抗体结合于相同或实质上相同表位(Lazarovits,A.I.等,J.Immunol.,133(4):1857-1862(1984);Schweighoffer等,J.Immunol.,151(2):717-729,1993;Bednarczyk等,J.Biol.Chem.,269(11):8348-8354,1994)。产生鼠类Act-1单克隆抗体的鼠类ACT-1杂交瘤细胞系是根据2001年8月22日的布达佩斯条约(Budapest Treaty)的规定,以Millennium Pharmaceuticals,Inc.,40Landsdowne Street,Cambridge,Mass.02139,U.S.A.名义以寄存编号PTA-3663存放于美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection),10801University Boulevard,Manassas,Va.20110-2209,U.S.A.。在另一方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体是使用美国专利申请公布号2010/0254975中提供的CDR的人抗体或 $\alpha 4\beta 7$ 结合蛋白。

[0157] 在一个方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体抑制 $\alpha 4\beta 7$ 与其一个或多个配体(例如粘膜地址素(例如MAdCAM(例如MAdCAM-1))、纤维结合蛋白和/或血管地址素(VCAM))结合。灵长类动物MAdCAM(例如MAdCAM-1)描述于PCT公布W096/24673中,所述公布的全部教义以引用的方式并入本文。在另一方面,抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体抑制 $\alpha 4\beta 7$ 与MAdCAM(例如MAdCAM-1)和/或纤维结合蛋白结合而不抑制结合VCAM。

[0158] 在一个方面,适用于制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体是小鼠AcM抗体的人源化形式。适于制备人源化抗体的方法在本领域中是众所周知的。一般而言,人源化抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体将含有包含小鼠Act-1抗体的3个重链互补决定区(CDR,CDR1,SEQ ID NO:8、CDR2,SEQ ID NO:9和CDR3,SEQ ID NO:10)和适合人重链框架区的重链;且也含有包含小鼠Act-1抗体的3个轻链CDR(CDR1,SEQ ID NO:11、CDR2,SEQ ID NO:12及CDR3,SEQ ID NO:13)和适合人轻链框架区的轻链。人源化Act-1抗体可含有具有或不具有氨基酸取代的任何适合人框架区,包括共有框架区。举例而言,一个或多个框架氨基酸可经另一氨基酸(如小鼠Act-1抗体中相应位置处的氨基酸)置换。如果存在,则人恒定区或其部分可源于人抗体(包括对偶基因变体)的 κ 或 λ 轻链和/或 γ (例如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$)、 α (例如 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$)、 δ 或 ϵ 重链。可选择特定恒定区(例如IgG1)、其变体或部分以调整效应功能。举例而言,可将突变恒定区(变体)并入融合蛋白中以使与Fc受体的结合和/或固定补体的能力减至最小(参见例如Winter等,GB2,209,757B;Morrison等,W089/07142;Morgan等,W094/29351,1994年12月22日)。Act-1抗体的人源化形式描述于PCT公布号W098/06248和W007/61679中,其各自的全部教义以引用的方式并入本文。

[0159] 在另一方面,适用于制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 人源化抗体包含包括SEQ ID NO:2的氨基酸20至140的重链可变区;和包括SEQ ID NO:4的氨基酸20至131或SEQ ID NO:5的氨基酸21至132的轻链可变区。如果需要,则可存在适合人恒定区。举例而言,人源化抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可包含包括SEQ ID NO:2的氨基酸20至470的重链和包括SEQ ID NO:5的氨基酸21至239的轻链。在另一个实施例中,人源化抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可包含包括SEQ ID NO:2的氨基酸20至470的重链和包括SEQ ID NO:4的氨基酸20至238的轻链。图4显示比较人抗体与鼠类抗体的同属轻链比对。所述比对说明两个小鼠残基转换为人残基的维多珠单抗(例如化学文摘社(Chemical Abstract Service,CAS,美国化学学会(American Chemical Society))登记编号943609-66-3)的人源化轻链比LDP-02的轻链(图3)更类人。此外,LDP-02具有轻微疏水性、可挠性丙

氨酸114和亲水性位点(天冬氨酸115),其在维多珠单抗中置换为轻微亲水性的含羟基苏氨酸114和疏水性的可能面向内部的缬氨酸115残基。

[0160] 抗体序列的其它取代可为例如重链和轻链框架区的突变,如SEQ ID NO:14的残基2上的异亮氨酸突变为缬氨酸;SEQ ID NO:14的残基4上的甲硫氨酸突变为缬氨酸;SEQ ID NO:15的残基24上的丙氨酸突变为甘氨酸;SEQ ID NO:15的残基38处的精氨酸突变为赖氨酸;SEQ ID NO:15的残基40处的丙氨酸突变为精氨酸;SEQ ID NO:15的残基48上的甲硫氨酸突变为异亮氨酸;SEQ ID NO:15的残基69上的异亮氨酸突变为亮氨酸;SEQ ID NO:15的残基71上的精氨酸突变为缬氨酸;SEQ ID NO:15的残基73上的苏氨酸突变为异亮氨酸;或其任何组合;及用小鼠Act-1抗体的CDR(CDR1,SEQ ID NO:8、CDR2,SEQ ID NO:9和CDR3,SEQ ID NO:10)置换重链CDR;以及用小鼠Act-1抗体的轻链CDR(CDR1,SEQ ID NO:11、CDR2,SEQ ID NO:12和CDR3,SEQ ID NO:13)置换轻链CDR。

[0161] 在一些实施方案中,用于制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 人源化抗体包含与SEQ ID NO:2的氨基酸20至140具有约95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的重链可变区,以及与SEQ ID NO:4的氨基酸20至131或SEQ ID NO:5的氨基酸21至132具有约95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的轻链可变区。可使用缺省参数,使用适合序列比对算法(如Lasergene系统(DNASTAR, Inc., Madison, Wis))测定氨基酸序列一致性。在一个实施方案中,用于制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体是维多珠单抗(CAS,美国化学学会,登记编号943609-66-3)。

[0162] 其它 $\alpha 4\beta 7$ 抗体也可用于本文所述的制剂和给药方案中。举例而言,以全文引用的方式并入本文的US2010/0254975 (Amgen, Inc.)中描述的 $\alpha 4\beta 7$ 抗体适用于治疗个体的炎症性肠病的制剂和方法中。

[0163] 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可通过在活细胞(例如培养的细胞)中表达编码各链的核酸序列来产生。可利用多种宿主-表达载体系统来表达本发明的抗体分子。所述宿主-表达系统表示借此相关编码序列可产生且随后纯化的载体,但也表示当用适当核苷酸编码序列转化或转染时可原位表达抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的细胞。这些系统包括但不限于微生物,如用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘质粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌(*E. coli*)、枯草杆菌(*B. subtilis*));用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酵母(*Saccharomyces*)、毕赤酵母(*Pichia*));用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如花椰菜嵌纹病毒CaMV、烟草嵌纹病毒TMV)感染或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或具有含有源自哺乳动物细胞的基因组(例如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子、痘疮病毒7.5K启动子)的启动子的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、3T3、NS0细胞)。举例而言,与载体(如来自人巨大细胞病毒的主要中早期基因启动子元件)联合的哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(*Chinese hamster ovary cell*, CHO))是抗体的有效表达系统(Foecking 等, *Gene* 45:101 (1986); Cockett等, *Bio/Technology* 8:2 (1990))。

[0164] 在细菌系统中,许多表达载体宜视所表达的抗体分子的预期用途来选择。举例而言,当希望产生大量所述蛋白质以产生抗体分子的药物组合物时,指导表达高含量的易于纯化的融合蛋白产物的载体可为合乎需要的。所述载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等, *EMBO J.* 2:1791 (1983)),其中抗体编码序列可个别地与lac Z编码区同

框连接至载体中以便产生融合蛋白;pIN载体(Inouye和Inouye,Nucleic Acids Res.13:3101-3109(1985);Van Heeke和Schuster,J.Biol.Chem.24:5503-5509(1989))等.pGEX载体也可用于与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白形式表达外来多肽。一般而言,所述融合蛋白是可溶性的,并且可易于通过吸附及结合于基质谷胱甘肽-琼脂糖珠粒,随后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而从溶解细胞纯化。pGEX载体经设计以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位点以便可从GST部分释放克隆的目标基因产物。

[0165] 在一昆虫系统中,使用加洲苜蓿夜蛾核多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus,AcNPV)作为表达外来基因的载体。病毒生长于草地粘虫(Spodoptera frugiperda)细胞中。可将抗体编码序列个别地克隆至病毒的非必需区域(例如多角体蛋白基因)中且置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0166] 在哺乳动物宿主细胞中,可利用许多基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,相关抗体编码序列可连接至腺病毒转录/翻译控制复合物(例如晚期启动子和三联前导序列)。随后可通过体外或体内重组将这个嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入病毒基因组的非必需区域(例如区域E1或E3)中将产生生活的且能够在受感染宿主中表达抗体分子的重组病毒(例如参见Logan和Shenk,Proc.Natl.Acad.Sci.USA81:355-359(1984))。也可需要特定起始信号来有效翻译插入的抗体编码序列。这些信号包括ATG起始密码子和邻近序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框架同相以确保翻译全部插入物。这些外源翻译控制信号和起始密码子可具有多种来源,天然与合成两者均可。可通过包括适当转录增强子元件、转录终止子等来增强表达效率(参见Bittner等,Methods in Enzymol.153:51-544(1987))。

[0167] 此外,可选择调节插入序列的表达或以所需特定方式修饰并加工基因产物的宿主细胞株。对蛋白质产物的所述修饰(例如糖基化)和加工(例如裂解)就蛋白质功能而言可为重要的。不同宿主细胞具有翻译后加工和修饰蛋白质和基因产物的特征性及特定机制。可选择适当细胞系或宿主系统以确保对表达的外来蛋白质进行适当修饰和加工。为此目的,可使用具有用于适当加工初级转录物、糖基化及磷酸化基因产物的细胞机制的真核宿主细胞。所述哺乳动物宿主细胞包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)、NS0、HeLa、VERY、幼小仓鼠肾(BHK)、猴、肾(COS)、MDCK、293、3T3、WI38、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)、乳癌细胞系(例如像BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D)以及正常乳腺细胞系(例如像CRL7030和Hs578Bst)。

[0168] 不同细胞类型的糖基化机制可产生糖基化组成不同于另一细胞类型或无糖基化(如在细菌细胞的情况下)的抗体。在一个方面,用于产生抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的细胞类型是哺乳动物细胞,如NS0或CHO细胞。在一个方面,哺乳动物细胞可包含缺失细胞代谢中涉及的酶,并且相关外源基因可例如在用于例如通过转化或转染引入细胞中的构建体或载体中可操作地连接于置换酶。具有外源基因的构建体或载体赋予宿有构建体或载体的细胞以选择优势,从而促进产生由外源基因编码的多肽。在一个实施方案中,CHO细胞是DG44细胞(Chasin和Urlaub(1980)PNAS USA77:4216),其包含缺失或不活化二氢叶酸还原酶基因。在另一个实施方案中,CHO细胞是CHO K1细胞,其包含缺失或不活化谷氨酰胺合成酶基因(参见例如美国专利号5,122,464或5,827,739)。

[0169] 固体制剂

[0170] 本发明的固体制剂通常通过干燥液体制剂来制备。可使用任何适合干燥方法,如

冻干或喷雾干燥。在一个方面,在冻干之前添加冻干保护剂至制剂中。冻干涉及通常在将用于储存、运送和分配制剂的容器(例如小瓶、注射器(例如单室或双室注射器)或药筒(例如单室或双室药筒))中冷冻液体制剂(参见例如Gatlin和Nail, Protein Purification Process Engineering, Roger G. Harrison编, Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994))。一旦冷冻制剂,即降低大气压且调节温度以允许例如通过升华移除冷冻溶剂。冻干过程的这个步骤有时称为初级干燥。如果需要,则随后可升高温度以通过蒸发移除仍结合于干燥制剂的任何溶剂。冻干过程的这个步骤有时称为二级干燥。当制剂已达到所需干燥程度时,结束干燥过程且密封容器。最终固体制剂有时称为“冻干制剂”或“饼”。冻干过程可使用任何适合设备来进行。适合冻干设备可从许多商业来源(例如SP Scientific, Stone Ridge, NY)获得。

[0171] 可使用多种适合装置干燥液体制剂以产生固体(例如冻干)制剂。一般而言,本领域技术人员使用含有架子的密封室制备冻干制剂,在所述架子上置放含待干燥液体制剂的小瓶。可控制架子的温度以及冷却和加热速率,也可控制腔室内压力。应了解,本文所论述的各种过程参数是指使用这种类型装置进行的过程。如果需要,则普通技术人员可轻易使本文所述的参数适于其它类型的干燥装置。

[0172] 普通技术人员可轻易测定适用于初级和二级干燥的温度和真空量。一般而言,制剂于约-30℃或小于-30℃的温度(如-40℃或-50℃)下冷冻。冷却速率可影响基质中冰晶的量和尺寸。初级干燥通常在比冷冻温度高约10℃、约20℃、约30℃、约40℃或约50℃的温度下进行。在一个方面,可设定初级干燥条件以维持抗 α 4 β 7抗体低于制剂的玻璃转移温度或塌陷温度。高于塌陷温度时,非晶冷冻基质可流动(塌陷),从而导致蛋白质分子可能不被刚性固体基质所包围,并且蛋白质分子可在塌陷基质中不稳定。此外,如果发生塌陷,则制剂可难以充分干燥。制剂中产生的较高水分量可导致蛋白质降解率较高及在冻干产物的质量削弱至不可接受水平之前其可储存的时间量减少。在一个方面,选择架子温度和腔室压力以在初级干燥期间维持产物温度低于塌陷温度。冷冻制剂的玻璃转移温度可通过本领域中已知的方法(例如通过差示扫描热量测定(DSC))来测量。塌陷温度可通过本领域中已知的方法(例如冷冻干燥显微法、光学相干断层摄影法)来测量。干燥步骤可移除至少50%、至少60%、至少70%或70%以上的溶剂。在一个方面,初级干燥步骤从抗 α 4 β 7抗体制剂移除大于80%的溶剂。

[0173] 可基于在冻干期间暴露于架子和真空的表面积来选择小瓶尺寸。干燥时间与饼高度成正比,因此可基于测定为合理的饼高度来选择小瓶尺寸。直径相对于体积较大的小瓶可提供与架子的大量接触以在冻干循环期间实现有效热传递。在大体积液体中的稀释抗体溶液将需要更多干燥时间。小瓶尺寸与制剂体积需要达到平衡,因为较大小瓶储存和运送起来更为昂贵且具有较大顶空与制剂比率,并且在长期储存期间可使高比例的制剂暴露于水分的降解效应。对于165mg剂量,抗 α 4 β 7抗体制剂的小瓶尺寸可为3mL、5mL或10mL。在一个方面,对于160mg/mL溶液,小瓶尺寸是5mL。

[0174] 选择用于冻干的药筒或注射器尺寸的原则类似于选择小瓶的原则。饼高度的深度也将随着高度增加而使干燥时间增加。必须使注射器或药筒的直径和尺寸与最终制剂体积平衡。较大直径可增加冻干饼中的水分吸收速率,因此增加在储存期间的水分降解效应。对于165mg剂量,抗 α 4 β 7抗体制剂体积可为1mL或2mL。在一个方面,对于160mg/mL溶液,注射器

或药筒尺寸大于1mL。

[0175] 在冻干之后,小瓶、注射器或药筒可在真空下密封,例如塞住。或者,可在密封之前使气体(例如干燥空气或氮气)进入容器。在涉及氧化的情况下,允许进入冻干腔室的气体可包含延迟或防止冻干产物氧化的气体。在一个方面,气体是非含氧气体,例如氮气或惰性气体,例如氦气、氖气、氩气、氪气或氙气。在另一方面,气体是氮气或氩气。

[0176] 用抗体制剂的治疗

[0177] 在一个方面,本发明提供一种治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括以有效治疗例如人的疾病或病症的量向受试者施用本文所述的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂。人受试者可为成人(例如18岁或18岁以上)、青少年或儿童。人受试者可为65岁或65岁以上人士。与替代性治疗给药方案不同,65岁或65岁以上的人受试者不需要对本文所述的给药方案进行任何修改,并且可施用本文所述的常规抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂。

[0178] 受试者可已对用免疫调节剂、TNF- α 拮抗剂或其组合进行的治疗缺乏足够反应、丧失反应或不耐受。患者可能先前已接受用至少一种用于炎性肠病的皮质类固醇(例如泼尼松(prednisone))治疗。对皮质类固醇的反应不足是指尽管经历至少一个包括等于每日30mg泼尼松的剂量口服2周或静脉内1周的4周诱导方案,仍有持续活动性疾病的征象和症状。对皮质类固醇的反应丧失是指逐渐减少皮质类固醇至低于等于每日口服10mg泼尼松的剂量的两次尝试失败。皮质类固醇的不耐性包括库欣氏(Cushing's)综合征、骨质减少/骨质疏松症、高血糖症、失眠症和/或感染的病史。

[0179] 免疫调节剂可为例如口服硫唑嘌呤(azathioprine)、6-巯基嘌呤或甲氨蝶呤(methotrexate)。对免疫调节剂的反应不足是指尽管经历至少一个8周方案或口服硫唑嘌呤($\geq 1.5\text{mg/kg}$)、6-巯基嘌呤($\geq 0.75\text{mg/kg}$)或甲氨蝶呤($\geq 12.5\text{毫克/周}$),仍有持续活动性疾病的征象和症状。免疫调节剂的不耐性包括但不限于恶心/呕吐、腹痛、胰腺炎、LFT异常、淋巴球减少症、TPMT遗传突变和/或感染。

[0180] TNF- α 拮抗剂是例如抑制TNF- α 的生物活性且优选结合TNF- α 的药剂,如单克隆抗体,例如REMICADE(英利昔单抗(infliximab))、HUMIRA(阿达木单抗(adalimumab))、CIMZIA(赛妥珠单抗(certolizumab pegol))、SIMPONI(戈利木单抗(golimumab));或循环受体融合蛋白,如ENBREL(依那西普(etanercept))。对TNF- α 拮抗剂的反应不足是指尽管经历5mg/kg IV(2个剂量相隔至少2周)英利昔单抗;一个80mg皮下剂量的阿达木单抗、随后一个40mg剂量(相隔至少两周);或400mg皮下赛妥珠单抗(2个剂量相隔至少2周)的至少一个4周诱导方案,仍有持续活动性疾病的征象和症状。对TNF- α 拮抗剂的反应丧失是指在先前临床益处之后的维持给药期间症状复发。TNF- α 拮抗剂的不耐性包括但不限于输注相关反应、脱髓鞘、充血性心脏衰竭和/或感染。

[0181] 如本文所用,溃疡性结肠炎受试者的缓解维持丧失是指Mayo计分增加至少3分且修正Baron计分(Modified Baron Score)增加至少2。

[0182] 在另一方面,本发明提供抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂,所述制剂(1)可体外和/或体内结合 $\alpha 4\beta 7$ 整合素;以及(2)可调节 $\alpha 4\beta 7$ 整合素的活性或功能,如(a)拮合功能(例如 $\alpha 4\beta 7$ 整合素结合于MAdCAM(例如MAdCAM-1)、纤维结合蛋白和/或VCAM-1的能力)和/或(b)白细胞浸润功能,包括白细胞在组织中的募集和/或积聚(例如抑制淋巴细胞迁移至肠粘膜组织的能力)。在一个实施方案中,制剂中的抗体可结合 $\alpha 4\beta 7$ 整合素,并且可抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素结合于其一个

或多个配体(例如MAdCAM(例如MAdCAM-1)、VCAM-1、纤维结合蛋白),从而抑制白细胞浸润组织(包括白细胞在组织中的募集和/或积聚)。在另一个实施方案中,制剂中的抗体可结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合素,并且可选择性抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 整合素结合于其一个或多个配体(例如MAdCAM(例如MAdCAM-1)、VCAM-1、纤维结合蛋白),从而抑制白细胞浸润组织(包括白细胞在组织中的募集和/或积聚)。所述抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体制剂可体外和/或体内抑制携带 $\alpha 4 \beta 7$ 整合素的细胞细胞性粘着至粘膜组织(包括肠管相关组织、淋巴器官或白细胞(尤其是淋巴细胞,如T细胞或B细胞))中的血管内皮细胞。在另一个实施方案中,本发明的抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体制剂可抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 与MAdCAM(例如MAdCAM-1)和/或纤维结合蛋白相互作用。在另一个实施方案中,本发明的抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体制剂可选择性抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 与MAdCAM(例如MAdCAM-1)和/或纤维结合蛋白相互作用,例如而不抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 与VCAM相互作用。

[0183] 本发明的抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体制剂可用于调节(例如抑制(降低或阻止)) $\alpha 4 \beta 7$ 整合素的结合功能和/或白细胞(例如淋巴细胞、单核细胞)浸润功能。举例而言,抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 整合素结合于配体(即一个或多个配体)的人源化免疫球蛋白可根据治疗与白细胞(例如淋巴细胞、单核细胞)浸润组织(特别是表达分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)的组织)(包括白细胞在组织中的募集和/或积聚)相关的疾病的方法加以施用。

[0184] 向个体(例如哺乳动物,如人或其它灵长类动物)施用有效量的本发明的抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体制剂(即一种或多种制剂)来治疗所述疾病。举例而言,可根据本发明方法治疗发炎疾病,包括与白细胞浸润胃肠道(包括肠管相关内皮)、其它粘膜组织或表达分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)的组织(例如肠管相关组织,如小肠和大肠的固有层的微静脉;以及乳腺(例如泌乳性乳腺))相关的疾病。类似地,可根据本发明治疗患有与由于白细胞结合于表达MAdCAM(例如MAdCAM-1)的细胞(例如内皮细胞)所致的白细胞浸润组织相关的疾病的个体。

[0185] 在一个实施方案中,可治疗的疾病因此包括炎性肠病(IBD),如溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、回肠炎、乳糜泻(Celiac disease)、非热带口炎性腹泻(nontropical Sprue)、与血清阴性关节病相关的肠病、显微性或胶原性结肠炎、嗜酸性胃肠炎、或直肠结肠切除术和回肠肛门(ileoanal)吻合术后所致的囊炎(pouchitis)。在一些实施方案中,炎性肠病是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。溃疡性结肠炎可为中度至重度活动性溃疡性结肠炎。治疗可使罹患中度至重度活动性溃疡性结肠炎的患者粘膜愈合。治疗也可使患者的皮质类固醇使用减少、消除或减少以及消除。

[0186] 胰腺炎和胰岛素依赖型糖尿病是可使用本发明的制剂治疗的其它疾病。已报道MAdCAM(例如MAdCAM-1)是由来自NOD(非肥胖性糖尿病)小鼠以及BALB/c和SJL小鼠的外分泌胰脏中的一些血管表达。MAdCAM(MAdCAM-1)的表达据报道诱导于NOD小鼠的胰脏的发炎胰岛中的内皮上,并且MAdCAM(MAdCAM-1)是在胰岛炎早期由NOD胰岛内皮表达的主要地址素(Hanninen,A.等,J.Clin.Invest.,92:2509-2515(1993))。用抗MAdCAM或抗 $\beta 7$ 抗体治疗NOD小鼠预防了糖尿病的发展(Yang等,Diabetes,46:1542-1547(1997))。此外,观察到表达 $\alpha 4 \beta 7$ 的淋巴细胞在胰岛内积聚,并且MAdCAM-1牵涉于淋巴瘤细胞通过 $\alpha 4 \beta 7$ 与来自发炎胰岛的血管(Hanninen,A.等,J.Clin.Invest.,92:2509-2515(1993))或与套细胞淋巴瘤中的胃肠道(Geissmann等,Am.J.Pathol.,155:1701-1705(1998))的结合中。

[0187] 可使用本发明的制剂治疗的与粘膜组织相关的发炎疾病的实例包括胆囊炎、胆管炎(Adams和Eksteen,Nature Reviews6:244-251(2006);Grant等,Hepatology33:1065-

1072 (2001)) (例如原发性硬化性胆管炎)、例如肠的白塞氏病 (Behcet's disease) 或胆管周围炎 (胆管和肝脏的周围组织) 以及移植物抗宿主疾病 (例如在胃肠道中 (例如在骨髓移植之后) (Petrovic等, Blood 103:1542-1547 (2004)))。如克罗恩氏病中所见, 发炎常延伸超出粘膜表面, 因此慢性发炎疾病 (如类肉瘤病、慢性胃炎 (例如自体免疫胃炎 (Katakai等, Int. Immunol., 14:167-175 (2002))) 和其它特发性病状) 可经受治疗。

[0188] 本发明也涉及一种抑制白细胞浸润粘膜组织的方法。本发明也涉及一种治疗癌症 (例如 $\alpha 4\beta 7$ 阳性肿瘤, 如淋巴瘤) 的方法。可使用本发明的制剂治疗的与粘膜组织相关的发炎疾病的其它实例包括乳腺炎 (乳腺) 和大肠急躁症 (irritable bowel syndrome)。

[0189] 其病因利用MAdCAM (例如MAdCAM-1) 与 $\alpha 4\beta 7$ 的相互作用的疾病或病原体可用本文所述的制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体来治疗。所述疾病的实例包括如由人免疫缺乏病毒引起的免疫缺乏病症 (参见例如W02008140602)。

[0190] 本发明的制剂是以抑制 $\alpha 4\beta 7$ 整合素结合于其配体的有效量施用。对于疗法, 有效量将足以实现所需治疗 (包括防治) 作用 (如足以降低或防止 $\alpha 4\beta 7$ 整合素介导的结合和/或信号传导, 从而抑制白细胞粘着和浸润和/或相关细胞反应的量)。有效量的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体 (例如足以维持 $\alpha 4\beta 7$ 整合素的饱和 (例如中和) 的有效效价) 可诱导炎性肠病的临床反应或缓解。有效量的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体可导致溃疡性结肠炎或克罗恩氏病中的粘膜愈合。本发明的制剂可以单位剂量或多个剂量施用。剂量可通过本领域中已知的方法确定且可视例如个体的年龄、敏感性、耐受性和总体健康而定。施用模式的实例包括局部途径, 如经鼻或吸入或经皮施用; 肠内途径, 如通过饲管或栓剂; 以及肠胃外途径, 如静脉内、肌内、皮下、动脉内、腹膜内或玻璃体内施用。抗体的适合剂量可为每次治疗约0.1mg/kg体重至约10.0mg/kg体重, 例如约2mg/kg至约7mg/kg、约3mg/kg至约6mg/kg或约3.5mg/kg至约5mg/kg。在特定实施方案中, 施用的剂量是约0.3mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg或约10mg/kg。总剂量可为约22mg、约50mg、约72mg、约125mg、约165mg或约432mg。总剂量可为至少77mg、至少125mg或至少356mg。在一个实施方案中, 总剂量是165mg。在另一个实施方案中, 总剂量是108mg。在另一个实施方案中, 总剂量是216mg。

[0191] 使用抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体在施用之后随时间的可用性研究的药物动力学 (PK) 数据的建模和模拟 (BERKELEY MADONNATM软件, University of California) 可评估皮下或肌内施用的可能给药方案。可评估诱导和维持方案的PK数据。另一建模方法是群体药物动力学/药效学分析 (NONMEM[®]非线性混合效应建模工具, ICON plc, Dublin, Ireland)。可分析暴露量与谷底量两者。

[0192] 通常, 在实现目标 (例如 $\alpha 4\beta 7$ 整合素) 饱和之后, 血液中的抗体浓度与施用剂量具有线性关系。通过皮下或肌内途径施用的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的生物可用性是通过静脉内途径施用的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的生物可用性的约60%至约90%。在这种关系的一个实施例, 如果假定静脉内剂量具有100%生物可用性且发现皮下剂量具有69.5%生物可用性, 则300mg静脉内剂量可与通过皮下施用的432mg剂量匹配。因此, 在69.5%相对生物可用性下, 150mg静脉内剂量可与216mg皮下剂量匹配。类似地, 如果发现皮下剂量具有75%可用性且发现肌内剂量具有80%生物可用性, 则为了匹配300mg静脉内剂量, 皮下剂量可为400mg且肌内剂量可为375mg。实施例中的表40-43说明这些关系且提供抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的适用剂量和给药方案。

[0193] 在一些方面,给药方案具有两个时期,即诱导期和维持期。在诱导期中,以快速提供适于某些目的(如诱导对抗体或其抗原结合片段的免疫耐受性或诱导临床反应及改善炎性肠病症状)的有效量的抗体或其抗原结合片段的方式施用抗体或其抗原结合片段。当首次用抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体治疗时;当从抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体疗法以来长期缺乏治疗之后(例如超过三个月、超过四个月、超过六个月、超过九个月、超过一年、超过十八个月或超过两年)又进行治疗时;或在抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体疗法的维持期期间,如果炎性肠病症状已重现(例如从疾病缓解复发开始);则可对患者施用诱导期治疗。在一些实施方案中,诱导期方案产生高于在维持方案期间维持的平均稳态谷底血清浓度的平均谷底血清浓度,例如在下一剂量之前即刻的浓度。

[0194] 在维持期中,用稳定含量的抗体或其抗原结合片段以使由诱导疗法实现的反应延续的方式施用抗体或其抗原结合片段。维持方案可防止炎性肠病的症状重现或复发。维持方案可向患者提供便利,例如作为简单给药方案或无需频繁治疗就诊。在一些实施方案中,维持方案可包括通过选自以下组成的组的策略,例如以本文所述的制剂形式施用抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体或其抗原结合片段:小剂量、不频繁施用、自身施用及前述任一个的组合。

[0195] 在一个实施方案中,例如在疗法的诱导期期间,给药方案提供有效量的于本文所述的制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体或抗原结合片段用于诱导人患者的炎性肠病的缓解。在一些实施方案中,有效量的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体足以在诱导期结束时实现抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的平均谷底血清浓度约 $5\mu\text{g/ml}$ 至约 $60\mu\text{g/ml}$ 、约 $15\mu\text{g/ml}$ 至约 $45\mu\text{g/ml}$ 、约 $20\mu\text{g/ml}$ 至约 $30\mu\text{g/ml}$ 或约 $25\mu\text{g/ml}$ 至约 $35\mu\text{g/ml}$ 。诱导期的持续时间可为治疗约四周、约五周、约六周、约七周或约八周。在一些实施方案中,诱导方案可利用选自以下组成的组的策略:例如于本文所述的制剂中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体或其抗原结合片段的大剂量、频繁施用以及大剂量与频繁施用的组合。诱导给药可为一次或复数次一个以上剂量,例如至少两个剂量。在诱导期期间,剂量可以每日一次、每隔一天一次、每周两次、每周一次、每十天一次、每两周一次或每三周一次施用。在一些实施方案中,诱导剂量是在抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体疗法的前两周内施用。在一个实施方案中,诱导给药可为在治疗开始(第0天)时一次和在治疗开始之后约两周时一次。在另一个实施方案中,诱导期持续时间是六周。在另一个实施方案中,诱导期持续时间是六周且在前两周期间施用多个诱导剂量。

[0196] 在一些实施方案中,例如当开始治疗患有重度炎性肠病的患者(例如抗TNF α 疗法失败的患者)时,诱导期需要具有比患有轻度或中度疾病的患者更长期间。在一些实施方案中,患有重度疾病的患者的诱导期可具有至少6周、至少8周、至少10周、至少12周或至少14周的持续时间。在一个实施方案中,患有重度疾病的患者的诱导给药方案可包括第0周(开始治疗)一剂量、第2周一剂量和第6周一剂量。在另一个实施方案中,患有重度疾病的患者的诱导给药方案可包括第0周(开始治疗)一剂量、第2周一剂量、第6周一剂量和第10周一剂量。

[0197] 在一个实施方案中,例如在疗法的维持期期间,给药方案维持抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的平均稳态谷底血清浓度(例如下一剂量之前的平台浓度)约 $5\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\mu\text{g/mL}$ 、约 $7\mu\text{g/mL}$ 至约 $20\mu\text{g/mL}$ 、约 $5\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\mu\text{g/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $20\mu\text{g/mL}$ 、约 $15\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\mu\text{g/mL}$ 、或约 $9\mu\text{g/mL}$ 至约 $13\mu\text{g/mL}$ 。在另一个实施方案中,例如在疗法的维持期期间,给药方案维持抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的平均稳态谷底血清浓度约 $20\mu\text{g/mL}$ 至约 $30\mu\text{g/mL}$ 、约 $20\mu\text{g/mL}$ 至约 $55\mu\text{g/mL}$ 、约 $30\mu\text{g/mL}$ 至约 $45\mu\text{g/mL}$ 、约 $45\mu\text{g/mL}$ 至约 $55\mu\text{g/mL}$ 、或约 $35\mu\text{g/mL}$ 至约 $40\mu\text{g/mL}$ 。在另一个实施方案中,例

如在疗法的维持期期间,给药方案维持抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的长期平均血清浓度,例如暴露浓度(例如浓度-时间曲线下面积)约 $15\mu\text{g/mL}$ 至约 $40\mu\text{g/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\mu\text{g/mL}$ 、约 $18\mu\text{g/mL}$ 至约 $26\mu\text{g/mL}$ 、或约 $22\mu\text{g/mL}$ 至约 $33\mu\text{g/mL}$ 。在另一个实施方案中,例如在维持疗法期间,给药方案维持抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的长期平均血清浓度,例如暴露浓度(例如浓度-时间曲线下面积)约 $35\mu\text{g/mL}$ 至约 $90\mu\text{g/mL}$ 、约 $45\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\mu\text{g/mL}$ 、约 $52\mu\text{g/mL}$ 至约 $60\mu\text{g/mL}$ 、或约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $65\mu\text{g/mL}$ 。

[0198] 最终剂型可在约 0.5mL 、约 1mL 、约 1.5mL 、约 2mL 、约 2.5mL 、约 3mL 抗体制剂中包含全部剂量。

[0199] 静脉内施用的最终剂型可在约 1.0mg/mL 至约 1.4mg/mL 、约 1.0mg/mL 至约 1.3mg/mL 、约 1.0mg/mL 至约 1.2mg/mL 、约 1.0mg/mL 至约 1.1mg/mL 、约 1.1mg/mL 至约 1.4mg/mL 、约 1.1mg/mL 至约 1.3mg/mL 、约 1.1mg/mL 至约 1.2mg/mL 、约 1.2mg/mL 至约 1.4mg/mL 、约 1.2mg/mL 至约 1.3mg/mL 、或约 1.3mg/mL 至约 1.4mg/mL 之间的浓度下。最终剂型可在约 0.6mg/mL 、 0.8mg/mL 、 1.0mg/mL 、 1.1mg/mL 、约 1.2mg/mL 、约 1.3mg/mL 、约 1.4mg/mL 、约 1.5mg/mL 、约 1.6mg/mL 、约 1.8mg/mL 或约 2.0mg/mL 的浓度下。

[0200] 剂量可每周一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每6周一次、每8周一次或每10周一次加以施用。较高或较频繁剂量(例如每隔一天、每周一次、每2周一次、每3周一次或每4周一次)可适用于诱导活动性疾病的缓解或适用于治疗新患者,例如适用于诱导对抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的耐受性。每2周一次、每3周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每8周一次或每10周一次的剂量可适用于预防性疗法例如以维持患有慢性疾病的患者的缓解。在一个方面,治疗方案是在第0天、约第2周、约第6周时以及此后每1或每2周时进行治疗。在另一方面,诱导治疗方案是每隔一天进行治疗,持续总共6次治疗。

[0201] 可将给药方案优化以诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解。在一些实施方案中,给药方案不改变接受治疗的患者的脑脊髓液中的CD4与CD8的比率。

[0202] 在一些方面,可用优化给药方案实现开始治疗之后六个月或一年内的持久临床缓解,例如持续护理医师进行至少两次、至少三次、至少四次随访的临床缓解。

[0203] 在一些方面,可用优化给药方案实现持久临床反应,例如开始治疗之后持续至少6个月、至少9个月、至少一年的临床反应。

[0204] 制剂可以单次或多次注射形式皮下施用。举例而言,单次注射的体积可在约 0.5mL 至约 3mL 范围内。在一个实施方案中,单次注射的体积可为约 0.6mL 至约 1.1mL 或约 1mL 至约 3mL 。在一个方面,单次注射的体积是约 1mL 。用于皮下施用制剂的针的规格可为约25G、约26G、约27G、约28G、约29G或约30G。

[0205] 制剂可以单次或多次注射形式肌内施用。举例而言,单次注射的体积可在约 0.5mL 至约 5mL 范围内。在一个实施方案中,单次注射的体积可为约 2mL 至约 5mL 、约 0.6mL 至约 1.1mL 或约 1mL 至约 3mL 。在一个方面,单次注射的体积是约 1mL 、约 2mL 、约 3mL 、约 4mL 或约 5mL 。用以肌内施用制剂的针可为约 $5/8''$ 、约 $7/8''$ 、约 $1''$ 、约 $1.25''$ 、约 $1.5''$ 、约 $2''$ 或约 $3''$ 。对于肌内施用,针的规格可在20-22G之间。

[0206] 在一个方面,本发明涉及一种治疗罹患炎性肠病的人患者的方法,其中所述方法包括步骤:向罹患炎性肠病的患者施用对人 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段,其中根据以下给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合

片段：(a) 每隔一天以皮下注射液形式施用165mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的初始剂量持续六剂；(b) 随后视需要每两周或每四周以皮下注射液形式施用165mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第七剂量和后续剂量；其中给药方案诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解；并且此外，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性，其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 以及重链可变区的三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3)：轻链：CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11；重链：CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、CDR3SEQ ID NO:14。

[0207] 在一个方面，本发明涉及一种治疗罹患炎性肠病的人患者的方法，其中所述方法包括步骤：向罹患炎性肠病的患者施用对人 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段包含非人来源的抗原结合区和至少一部分人来源的抗体，其中根据以下给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段：(a) 以静脉内输液形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的初始静脉内剂量；(b) 随后在初始剂量之后约两周时，以静脉内输液形式施用300mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第二静脉内后续剂量；(c) 随后从第六周开始，视需要每周、每两周或每三周以皮下注射液形式施用165mg人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的第三剂量和后续剂量；其中给药方案诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解；并且此外，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性，其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 以及重链可变区的三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3)：轻链：CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11；重链：CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、CDR3SEQ ID NO:14。

[0208] 在另一方面，本发明涉及一种用于治疗性治疗炎性肠病的给药方案，其中所述给药方案包括步骤：向罹患炎性肠病的患者施用对人 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段包含非人来源的抗原结合区和至少一部分人来源的抗体，其中根据皮下或肌肉内给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，所述给药方案维持抗体或其抗原结合片段的平均稳态血清谷底浓度为约9 $\mu\text{g/mL}$ 至约13 $\mu\text{g/mL}$ ；其中给药方案诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解；并且此外，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性，其中抗原结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 以及重链可变区的三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3)：轻链：CDR1SEQ ID NO:9、CDR2SEQ ID NO:10、CDR3SEQ ID NO:11；重链：CDR1SEQ ID NO:12、CDR2SEQ ID NO:13、CDR3SEQ ID NO:14。

[0209] 在另一方面，本发明涉及一种用于治疗性治疗炎性肠病的给药方案，其中所述给药方案包括步骤：向罹患炎性肠病的患者施用对人 $\alpha 4\beta 7$ 整合素具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段包含非人来源的抗原结合区和至少一部分人来源的抗体，其中根据皮下或肌肉内给药方案向患者施用人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，所述给药方案维持抗体或其抗原结合片段的稳态血清谷底浓度为约35 $\mu\text{g/mL}$ 至约40 $\mu\text{g/mL}$ ；其中给药方案诱导患者的炎性肠病的临床反应和临床缓解；并且此外，其中人源化免疫球蛋白或抗原结合片段对 $\alpha 4\beta 7$ 复合物具有结合特异性，其中抗原

结合区包含具有下述氨基酸序列的轻链可变区的三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 以及重链可变区的三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3): 轻链: CDR1SEQ ID NO: 9、CDR2SEQ ID NO: 10、CDR3SEQ ID NO: 11; 重链: CDR1SEQ ID NO: 12、CDR2SEQ ID NO: 13、CDR3SEQ ID NO: 14。

[0210] 在一些实施方案中, 治疗方法、剂量或给药方案降低患者将对抗 α 4 β 7抗体产生HAHA反应的可能性。例如由对抗 α 4 β 7抗体有反应性的抗体所测量, HAHA的产生可增加抗 α 4 β 7抗体的清除率, 例如降低抗 α 4 β 7抗体的血清浓度, 例如降低结合于 α 4 β 7整合素的抗 α 4 β 7抗体的数目, 由此使得治疗的有效性较小。在一些实施方案中, 为了防止HAHA, 可依次用诱导方案和维持方案治疗患者。在一些实施方案中, 在诱导方案与维持方案之间不存在中止。在一些实施方案中, 诱导方案包括向患者施用多个剂量的抗 α 4 β 7抗体。为了防止HAHA, 当开始抗 α 4 β 7抗体疗法时, 可用较高初始剂量 (例如至少1.5mg/kg、至少2mg/kg、至少2.5mg/kg、至少3mg/kg、至少5mg/kg、至少8mg/kg、至少10mg/kg或约2mg/kg至约6mg/kg) 或频繁初始施用 (例如约每周一次、约每两周一次或约每三周一次) 标准剂量来治疗患者。在一些实施方案中, 治疗方法维持至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%患者呈HAHA阴性。在其它实施方案中, 治疗方法维持患者呈HAHA阴性持续至少6周、至少10周、至少15周、至少6个月、至少1年、至少2年或持续疗法持续时间。在一些实施方案中, 患者或至少30%、至少40%、至少50%或至少60%的产生HAHA的患者维持低效价 (例如 ≤ 125) 的抗 α 4 β 7抗体。在一个实施方案中, 在开始抗 α 4 β 7抗体疗法之后, 治疗方法维持至少70%患者呈HAHA阴性持续至少12周。

[0211] 制剂可单独或与另一药剂联合向个体 (例如人) 施用。本发明的制剂可在另一药剂施用之前、与另一药剂一起施用或在另一药剂施用之后施用。在一个实施方案中, 施用一种以上抑制 α 4 β 7整合素结合于其配体的制剂。在所述实施方案中, 可施用药剂, 例如单克隆抗体, 如抗MAdCAM或抗VCAM-1单克隆抗体。在另一个实施方案中, 另一药剂抑制白细胞结合于不同于 α 4 β 7路径的路径中的内皮配体。所述药剂可抑制例如表达趋化因子 (C-C基元) 受体9 (CCR9) 的淋巴细胞结合于胸腺表达的趋化因子 (TECK或CCL25) 或是防止LFA-1结合于细胞间粘着分子 (ICAM) 的药剂。举例而言, 除本发明的制剂的之外, 也施用抗TECK或抗CCR9抗体或小分子CCR9抑制剂 (如公开于PCT公布W003/099773或W004/046092中的抑制剂) 或抗ICAM-1抗体或阻止ICAM表达的寡核苷酸。在另一个实施方案中, 可与本发明的制剂联合施用另一活性成分, 例如消炎化合物, 如含有柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、5-氨基水杨酸的消炎剂; 另一非类固醇消炎化合物; 类固醇消炎化合物; 或通常为控制IBD而施用的抗生素 (例如环丙沙星 (ciprofloxacin)、甲硝达唑 (metronidazole)); 或另一生物药剂 (例如TNF α 拮抗剂)。

[0212] 在一个实施方案中, 共施用药物的剂量可在用包含抗 α 4 β 7抗体的制剂治疗期间随时间减少。举例而言, 在用抗 α 4 β 7抗体制剂治疗开始时或之前用类固醇 (例如泼尼松、泼尼龙) 治疗的患者将经历早在用抗 α 4 β 7抗体制剂治疗6周时即开始的类固醇剂量减少方案。在用抗 α 4 β 7抗体制剂治疗期间, 类固醇剂量将在开始逐渐减少的4-8周内减少约25%, 在逐渐减少的约8-12周时减少50%且在逐渐减少的约12-16周时减少75%。在一个方面, 通过用抗 α 4 β 7抗体制剂治疗约16-24周, 可消除类固醇剂量。在另一个实施例中, 在用抗 α 4 β 7抗体制剂治疗开始时或之前用消炎化合物 (如6-巯基嘌呤) 治疗的患者将经历类似于如上所指示

的类固醇给药逐渐减少方案的消炎化合物剂量减少方案。

[0213] 在一个实施方案中,所述方法包括向患者皮下施用或肌肉施用有效量的本发明的制剂。在另一个实施方案中,可制备用于自身施用的制剂。

[0214] 如果制剂呈固体形式,例如干燥状态,则施用方法可包含使制剂转化为液态的步骤。在一个方面,干燥制剂可例如用如上所述的液体复原以用于注射,例如静脉内、肌肉或皮下注射。在另一方面,固体或干燥制剂可例如以贴片、霜剂、气溶胶或栓剂形式局部施用。

[0215] 本发明也关于一种治疗与白细胞浸润表达分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)的组织相关的疾病的方法。所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂。在一个实施方案中,所述疾病是移植物抗宿主疾病。在一些实施方案中,所述疾病是与由于表达 $\alpha 4\beta 7$ 整合素的白细胞结合于表达分子MAdCAM(例如MAdCAM-1)的肠管相关内皮所致的白细胞浸润组织相关的疾病。在其它实施方案中,所述疾病是胃炎(例如嗜酸性胃炎或自体免疫胃炎)、胰腺炎或胰岛素依赖型糖尿病。在其它实施方案中,所述疾病是胆囊炎、胆管炎或胆管周围炎。

[0216] 本发明也关于一种治疗患者的炎性肠病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向患者皮下施用有效量的本发明的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂。在一些实施方案中,炎性肠病是溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。在其它实施方案中,炎性肠病是乳糜泻、与血清阴性关节病相关的肠病、显微性或胶原性结肠炎、胃肠炎(例如嗜酸性胃肠炎)或囊炎。

[0217] 在一些实施方案中,用抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体治疗不改变CD4:CD8淋巴细胞的比率。可测量血液、淋巴结吸出物及脑脊髓液(CSF)中的CD4:CD8比率。健康个体中的CSF CD4+:CD8+淋巴细胞比率通常大于或等于约1。(Svenningsson等,J.Neuroimmunol.1995;63:39-46;Svenningsson等,Ann Neurol.1993;34:155-161)。免疫调节剂可使CD4:CD8比率变得小于1。

[0218] 制品

[0219] 在另一方面,本发明是含有本发明的药物制剂且提供其使用说明书的制品。制品包含容器。适合容器包括例如瓶、小瓶(例如双室小瓶;液体制剂的小瓶,有针或无针;固体制剂的小瓶,有或无复原液体的小瓶,有针或无针)、注射器(如双室注射器、预装载注射器、自动注射器)、药筒和试管。容器可由多种材料(如玻璃、金属或塑料)形成。容器容纳制剂且于容器上或与容器相伴的标签可指示使用说明。在另一个实施方案中,可制备制剂以供自身施用和/或含有针对自身施用的说明。在一个方面,容纳制剂的容器可为单次使用小瓶。在另一方面,容纳制剂的容器可为多次使用小瓶,其允许例如使用复原制剂的一个以上部分重复施用(例如2-6次施用)制剂。制品可进一步包括从商业和使用者立场出发所需的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有如先前章节所述的使用说明的药品说明书。

[0220] 在一个实施方案中,制品是具有针的注射器。针的规格可为25G、26G、27G、29G、30G。薄壁针(例如19G或23G或大于23G)可有助于注射高粘度制剂。在一个方面,针规格是27G或大于27G。针长度可适于皮下施用,并且可为约1/2英寸、约5/8英寸或1英寸长。在一些实施方案中,注射器是预填充注射器。

[0221] 预填充注射器产品开发

[0222] 在一些方面,有数种产品属性是为预填充注射器(PFS)(例如用于施用制剂以实现

皮下或肌内传递)中的蛋白质产品(例如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体)所需的。平衡其中一些属性有助于减轻竞争效应。举例而言,当需要低注射体积时,制剂的高蛋白质浓度可为优选的。然而,在高蛋白质浓度情况下,可存在较高杂质形成率(例如从注射器浸入制剂中的聚集杂质)且需要较大手动力来操作注射器。为了患者在注射部位处的舒适性所用的小针尺寸可需要较大力来操作注射器。了解制剂与注射器参数(如蛋白质浓度、pH和针内径)两者如何影响产品稳定性和性能会有助于开发蛋白质产品(例如预填充注射器中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体)。

[0223] 在一个方面,一种开发用于预填充注射器中的蛋白质产品(例如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体)的方法包括例如以协调方式或同时一起改变注射器参数和制剂参数。这样可使得比在单独或连续改变各方面时更好地了解对预填充注射器中的蛋白质产品所预期的蛋白质稳定性和产品性能的范围。

[0224] 预填充注射器产品(例如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体)的开发涉及了解在某一点,液体制剂与预填充注射器的若干组分有接触(图15)。举例而言,制剂可接触可由玻璃(例如I型硼硅玻璃)或塑料(例如环烯烃聚合物(COP)、环烯烃共聚物(COC)、聚丙烯或聚四氟乙烯)构成的注射器筒。制剂可接触注射器、柱塞和/或端帽(tip cap),其可为弹性体(例如为相同或不同材料(例如塑料(如聚乙烯、聚苯乙烯或聚丙烯,或弹力物(如橡胶(天然、合成、丁基))或聚硅氧)的弹性体)。制剂可与添加至筒的内表面以便于柱塞移动的润滑剂接触。润滑剂可为例如聚硅氧油、矿物油或甘油。在押针(staked needle)注射器的实施方案中,可存在金属合金针(例如不锈钢针和用于将针胶粘于适当位置的粘着剂)。针对预填充注射器中蛋白质产品的一考虑因素是在产品的整个存放期期间液体蛋白质溶液与这些注射器组分的一个或多个直接接触。制剂与注射器组分两者均可对产品的稳定性有影响。

[0225] 可影响预填充注射器产品稳定性的制剂参数包括蛋白质浓度、pH、缓冲剂类型、缓冲剂浓度、离子强度、稳定剂类型和稳定剂浓度。用于蛋白质制剂的稳定剂的实例包括例如如先前章节中所述的离子盐、多糖、氨基酸、抗氧化剂、螯合剂和表面活性剂。

[0226] 可影响预填充注射器产品稳定性的注射器组分包括例如润滑剂、柱塞和端帽的组成、以及杂质。润滑剂(例如注射器筒上的聚硅氧油)的量可影响产品稳定性。柱塞和端帽的组成可影响这些组分的透氧性且将这些组分的可浸出物引入蛋白质产品(例如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂)中,也可影响产品稳定性。可影响产品稳定性的另一注射器参数包括可渗入产品制剂(例如从筒(例如玻璃筒)和/或针(例如不锈钢针))的杂质(例如重金属(例如钨))的类型和/或量。(也参见Ludwig等,J.Pharm.Sci.99:1721-1733(2010);Nashed-Samuel等,American Pharmaceutical Review Jan/Feb:74-80(2011);B adkar等,AAPS PharmSciTech12:564-572)

[0227] 预填充注射器可手动注射或与自动注射器装置一起使用。预填充注射器的功能测试包括测量脱开力(break-loose force),即开始移动柱塞所需的力;和滑动力,即以恒定速率注射注射器的内含物所需的力。预填充注射器的机械性能可视数种制剂和注射器参数(如制剂粘度和注射器中润滑剂(例如聚硅氧油)的量)而定。

[0228] 预填充注射器中的蛋白质产品的数种属性和可影响那些产品属性的制剂或注射器因素显示于表1中。许多产品属性可为数种制剂和注射器参数的复合函数。举例而言,注射器滑动力是制剂粘度的函数,但粘度可视数种制剂因素(如蛋白质浓度、稳定剂浓度和pH)而定。

[0229] 表1:预填充注射器中的蛋白质产品的产品属性和可影响这些属性的可能制剂和注射器参数

[0230]	产品属性	可影响产品属性的蛋白质制剂参数	可影响产品属性的注射器参数
	重量摩尔渗透浓度	稳定剂浓度、pH、蛋白质浓度	无
	粘度	稳定剂浓度、pH、蛋白质浓度	无
	注射器脱开力和滑动力	粘度、蛋白质浓度、表面活性剂浓度	注射速度、针长度、针ID、注射器筒ID、聚硅氧油量、柱塞制剂和形状
	蛋白质脱酰胺速率	稳定剂浓度、pH、蛋白质浓度	无
	蛋白质氧化速率	稳定剂/抗氧化剂浓度、pH、蛋白质浓度、表面活性剂浓度、溶氧	柱塞和端帽制剂(透氧性)、重金属杂质含量、气泡尺寸
	可溶性聚集体形成率	稳定剂浓度、pH、蛋白质浓度、表面活性剂浓度、呈溶解状态的溶氧	聚硅氧油量、重金属杂质含量、气泡尺寸
	显微镜下可见(Sub-visible)和可见蛋白质微粒形成率	稳定剂浓度、pH、蛋白质浓度、表面活性剂浓度	聚硅氧油量、重金属杂质含量、气泡尺寸、注射器内表面积

[0231] 在一个方面,可添加表面活性剂(如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)至预填充注射器中的蛋白质制剂中(例如以防止蛋白质分子在液体/空气和/或液体/润滑剂(例如聚硅氧油)界面处吸附和变性)。蛋白质分子的表面吸附和变性可为显微镜下可见和可见蛋白质颗粒成核的一种机制。因此,添加表面活性剂至预填充注射器中可减少预填充注射器产品中的显微镜下可见和可见颗粒的形成。在一个实施方案中,少量表面活性剂可乳化润滑剂(例如溶液中的聚硅氧油小滴,并且从而减少显微镜下可见和可见润滑剂(例如聚硅氧油小滴)形成)(Ludwig等,上文)。在另一个实施方案中,归因于大量表面活性剂对蛋白质制剂的可能有害作用,将制剂中的表面活性剂的量减至最少。存在于聚山梨醇酯中的过氧化物杂质可导致蛋白质氧化增加(Wang和Wang J.Pharm.Sci.91:2252-2264(2002))。大量表面活性剂可乳化来自注射器壁的大量聚硅氧油且导致在存放期内功能性滑动力增加。应设计产品开发研究以检验不同表面活性剂含量对产品稳定性与注射器性能两者的影响。

[0232] 蛋白质/PFS系统中的制剂与注射器参数之间的复杂相互作用可经受使用质量源于设计(QbD)或实验设计(DOE)方法对这些系统进行检验。可设计同时改变制剂和注射器参数的研究以获得对这些复杂系统的更好了解。由此得到开发预填充注射器产品的综合方法。表2显示可加入预填充注射器产品的实验设计中的输入参数和含量的实施例以及将要采用的分析测试的实施例。视用于QbD研究的实验设计的类型而定,实验数目可在9(针对筛选设计)至81(针对全因子设计)(所有可能组合)之间变化。实验数目越大,可解析的产品参数之间的相互作用的数目越大。为此分析设计的软件(例如JMP®统计发现软件(statistical discovery software)(Cary,NC))可有助于QbD研究。这项分析获得对制剂

参数与注射器参数如何相互作用以影响产品属性的定量了解。

[0233] 表2:预填充注射器中的液体蛋白质产品的实验设计的实施例

[0234]	制剂输入参数	含量	分析测试
	蛋白质浓度	50 mg/mL、100 mg/mL、150 mg/mL	• 通过尺寸排阻色谱法和离子交换色谱测试蛋白质稳定性
	pH	5.5、6.5、7.5	• 使用力测试来测试随时间的脱开力和滑动力
	表面活性剂浓度	0.01%、0.08%、0.15%	• 使用微流成像或库尔特计数器测试显微镜下可见蛋白质颗粒和聚硅氧油小滴随时间的形成
	注射器中的聚硅氧油的量	每注射器0.2 mg、0.5 mg、0.8 mg	

[0235] 以下给出可从表2中所示的示例性实验获得的预测模型的一个实施例,其中 C_n 为数值常数。

[0236] 可溶性聚集体随时间的形成= $C_0+C_1[\text{蛋白质浓度}]+C_2[\text{蛋白质浓度}]^2+C_3[\text{pH}]+C_4[\text{表面活性剂浓度}]+C_5[\text{润滑剂量}]$

[0237] 众多注射器参数可影响产品稳定性和性能,因此一个实施方案包括表征注射器参数的容许公差如何影响产品稳定性和效能。注射器筒上的润滑剂(例如聚硅氧油)的量在各注射器之间可变化50%-100%。所述量的这种变化可影响如表1中所示的数种产品特征。注射器筒的内径在各注射器之间可不同,其影响注射力。在押针注射器中,针内径在各批次之间或在各制造商之间可不同,其将影响注射力。通过使用QbD方法检验注射器参数如何影响性能,可获得可用于估计注射器参数的容许公差可如何影响产品性能的预测模型。使用QbD方法获得的预测模型可用于选择满足所需产品属性的制剂和注射器参数且预测产品稳定性和性能。

[0238] 预填充注射器可含有向蛋白质制剂中添加的聚硅氧乳液或钨。可存在于预填充注射器中的聚硅氧的示例性量在约0.3mg至约0.8mg范围内。在一个方面,可存在于预填充注射器中的聚硅氧的量是约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg或约0.8mg。在另一方面,制剂的粘度将在2cP至60cP范围内,从而在200毫米/分钟速度下产生注射力5N至80N。在另一方面,制剂的粘度将在4cP至27cP范围内,从而在200毫米/分钟速度下产生注射力10N至40N。

[0239] 通过参考以下实施例将更充分了解本发明。然而,其不应解释为限制本发明的范围。所有文献和专利引用都以引用的方式并入本文。

[0240] 制备制剂的方案

[0241] 在切向流过滤系统中透滤抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体溶液以达到柠檬酸盐、组氨酸、精氨酸缓冲剂的规定浓度,随后汇合且与聚山梨醇酯80于柠檬酸盐、组氨酸、精氨酸缓冲液中的溶液混合。将溶液于2L或5L瓶中储存于-70℃下。随后解冻溶液且经0.2 μm 过滤器过滤两次。将约1.0mL填充至灭菌注射器中且用灭菌柱塞(塞子)封闭。储存制剂且在2℃至8℃下于注射器中运送最终药物产品。

实施例

[0242] 实施例1

[0243] 制剂制造

[0244] 因素

[0245] 赋形剂浓度

[0246] 测试抗体制剂中的聚集体形成。根据检验蛋白质浓度、pH和表面活性剂：蛋白质摩尔比的实验数据产生SEC聚集体模型。在6.0至6.5的pH范围下，聚集体形成类似于0.7至1.5的聚山梨醇酯80与蛋白质摩尔比范围下的聚集体形成。(图6)一般而言，在PS80：蛋白质比率大于1.5时，聚集体形成率随pH升高而增加。(图7)

[0247] 进行在空气存在下检验SEC聚集体形成的实验。将11种不同组成的不同制剂置于硼硅小瓶中且用具有空气顶空的弹性塞子加盖。产生一组相同制剂，并且用氩气代替空气顶空。这些样本在40℃下稳定置放两周。相较于具有氩气顶空的相同制剂，所有具有空气顶空的样本在实验结束时都产生大量聚集体。

[0248] 表3

[0249]

样本	蛋白质浓度(mg/ml)	蔗糖 (%)	组氨酸 (mM)	精氨酸 (mM)	PS 80 (%)	pH	聚集体空气样本 (%)	聚集体氩气样本 (%)
1	60	2	25	75	0.05	6.2	0.64	0.48
2	60	4	25	75	0.05	7	0.62	0.42
3	160	4	50	75	0.14	6.2	0.92	0.73
4	160	2	50	75	0.14	7	1.16	0.74

[0250]

5	60	2	50	125	0.05	7	1.28	0.33
6	60	4	50	125	0.05	6.6	0.48	0.36
7	160	4	25	125	0.14	7	1.04	0.70
8	160	2	25	125	0.14	6.2	1.06	0.75
9	160	3	25	75	0.14	6.6	1.09	0.78
10	110	3	50	125	0.10	6.2	0.65	0.47
11	110	2	25	75	0.10	6.6	0.90	0.62

[0251] 基于这些实验，推测SEC聚集体通过氧化或通过形成二硫键而形成。探究抗氧化剂和/或螯合剂的添加。在pH6.6下以聚山梨醇酯80与蛋白质摩尔比1.5制备含有40mM组氨酸、90mM精氨酸和160mg/mL蛋白质的制剂。向制剂中添加25mM柠檬酸盐、5mM柠檬酸盐、5mM EDTA、25mM半胱氨酸或5mM半胱氨酸。所有3种其它赋形剂都减少聚集体形成(图8)。按照柠檬酸盐>EDTA>半胱氨酸的性能顺序，将抗氧化剂和/或螯合剂的添加分级。相较于对照制剂，5mM或25mM柠檬酸盐都减少SEC聚集体形成。

[0252] 进行实验以确定pH、蛋白质浓度、柠檬酸盐浓度、组氨酸浓度和聚山梨醇酯80与蛋白质摩尔比的影响。pH从6.0变化至6.3，蛋白质浓度从60mg/mL变化至160mg/mL，柠檬酸盐浓度从0变化至25mM，组氨酸浓度从25mM变化至50mM，并且聚山梨醇酯80与蛋白质摩尔比从0.7变化至1.5。将制剂填充于1ml长的27G1/2"注射器(0.55+/-0.2mg聚硅氧)中。所有制剂都含有约125mM精氨酸。

[0253] 使用CEX和SEC测试40℃下历时两周的稳定性。结果(图9和表4)显示在制剂中存在25mM柠檬酸盐下，聚集体形成减少，而增加蛋白质浓度使聚集体形成率增加。在25℃和40℃下，单体的量显示与聚集体形成相反的趋势，而在5℃下，单体的量基本上无变化持续多达

24个月(表5)。

[0254] 另一组制剂探究在40℃、25℃、5℃下SEC聚集体在40-63mM柠檬酸盐存在下但无组氨酸下的形成率。在40℃下这些制剂中的聚集体形成率稍微高于具有组氨酸的制剂。然而，在5℃下，具有柠檬酸盐且无组氨酸的制剂中的聚集体形成率可与含有柠檬酸盐和组氨酸的制剂相当(表6)。再者，在5℃下，单体的量基本上无变化持续多达24个月(表7)。

[0255]

表4

制剂编号	蛋白质度 (mg/ml)	pH	组氨酸浓度 (mM)	柠檬酸盐浓度 (mM)	精氨酸浓度 (mM)	PS8 0:蛋白质 比	聚集体初始 量(%)	在5℃下 12个月之 后的聚集体 变化	在5℃下 24个月之 后的聚集体 变化	在25℃ 下12个 月之后 聚集体 变化	在40℃ 下1个月 之后的 聚集体 变化
1	62	6.4	50	25	125	0.7	0.4	0.1	0.1	0.7	0.2
2	60	6.4	50	0	125	1.5	0.4	0.5	1.1	1.5	0.4
3	157	6.4	50	25	125	1.5	0.4	0.2	0.3	1.3	0.5
4	161	6.3	50	0	125	0.7	0.4	0.6	0.7	2.5	0.8
5	60	6.2	50	25	125	1.5	0.4	0.2	0.2	0.5	0.2
6	110	6.0	50	0	125	0.7	0.4	0.4	0.6	1.7	0.7
7	162	6.2	50	25	125	0.7	0.4	0.3	0.3	1.1	0.5
8	160	6.0	50	0	125	1.5	0.4	0.4	0.6	2.2	0.9
9	169	6.3	25	25	125	0.7	0.5	--	0.3	--	0.6
10	158	6.3	25	25	123	1.0	0.5	--	--	--	0.6

表5

制剂编号	蛋白质度 (mg/ml)	pH	组氨酸浓度 (mM)	柠檬酸盐浓度 (mM)	精氨酸浓度 (mM)	PS8 0:蛋白质 比	单体的初始 量(%)	在5℃下 12个月之 后的单体 变化	在5℃下 24个月之 后的单体 变化	在25℃ 下12个 月之后 单体的 变化	在40℃ 下1个月 之后的 单体变 化
1	62	6.4	50	25	125	0.7	98.3	0.4	0.1	-2.5	-1.3
2	60	6.4	50	0	125	1.5	98.3	-0.2	-1.0	-3.9	-2.0
3	157	6.4	50	25	125	1.5	98.2	0.2	0.0	-3.1	-1.6
4	161	6.3	50	0	125	0.7	98.2	0.0	-0.4	-4.5	-2.1

5	60	6.2	50	25	125	1.5	98.3	0.3	0.2	-2.2	-1.4
6	110	6.0	50	0	125	0.7	98.3	0.1	-0.3	-3.6	-2.1
7	162	6.2	50	25	125	0.7	98.3	0.2	-0.1	-2.8	-1.7
8	160	6.0	50	0	125	1.5	98.3	-0.1	-0.4	-4.2	-2.3
9	169	6.3	25	25	125	0.7	98.2	--	-0.1	--	-1.8
10	158	6.3	25	25	123	1.0	98.1	--	--	--	-1.7

表6

制剂编号	蛋白质度 (mg/mL)	pH	组氨酸浓度 (mM)	柠檬酸盐浓度 (mM)	精氨酸浓度 (mM)	PS8 0:蛋白质摩尔比	聚集体的初始量 (%)	在5°C下12个月之后的聚集体变化	在5°C下24个月之后的聚集体变化	在25°C下12个月之后的聚集体变化	在40°C下1个月之后的聚集体变化
11	160	6.3	0	40	125	0.7	0.5	--	0.4	--	0.9
12	165	6.3	0	40	125	1.5	0.6	0.3	--	--	0.9
13	62	6.2	0	40	125	1.5	0.5	--	--	1.7	0.4
14	170	6.1	0	40	125	1.5	0.5	--	--	--	0.9
15	165	6.5	0	63	125	1.5	0.5	--	--	--	1.0
16	160	6.3	0	40	125	1.0	0.6	0.3	--	--	0.9

表7

制剂编号	蛋白质度 (mg/mL)	pH	组氨酸浓度 (mM)	柠檬酸盐浓度 (mM)	精氨酸浓度 (mM)	PS80:蛋白质摩尔比	单体的初始量 (%)	在5°C下12个月之后的单体变化	在5°C下24个月之后的单体变化	在25°C下12个月之后的单体变化	在40°C下1个月之后的单体变化
11	160	6.3	0	40	125	0.7	98.3	--	-0.3	--	-2.2

[0256]

[0257]

12	165	6.3	0	40	125	1.5	98.2	0.1	--	-3.4	-2.1
13	62	6.2	0	40	125	1.5	98.1	--	--	--	-1.4
14	170	6.1	0	40	125	1.5	98.1	--	--	--	-2.0
15	165	6.5	0	63	125	1.5	98.2	--	--	--	-2.3
16	160	6.3	0	40	125	1.0	98.2	0.1	--	--	-2.0

[0258] pH

[0259] 在5℃下进行数个pH实验以确定pH对CEX降解的影响。维多珠单抗抗体制剂包含160mg/ml抗 α 4 β 7抗体、125mM精氨酸、50mM组氨酸和25mM柠檬酸盐。在40℃、25℃和5℃下测试数个不同pH水平6.3、6.5、6.7和6.9下的稳定性。

[0260] 40℃下的CEX模型显示(图10) pH最大程度上影响CEX降解。含有组氨酸的制剂的pH随温度升高而降低,然而,显示柠檬酸盐制剂的pH不受温度影响(图11)。测定组氨酸/柠檬酸盐制剂在pH6.8下40℃下1周后、pH6.3-6.5下25℃下6个月和pH6.3-6.5下5℃下6个月具有良好稳定性。基于其它研究,对于pH范围6.2至6.9,在25℃和5℃下,制剂稳定性类似(表8和表9)。

表8

在25°C下相对面积%随时间的差异														
蛋白 浓度 (mg/ mL)	P H	组 氨 酸 浓 度 (m M)	柠 檬 酸 盐 浓 度 (m M)	精 氨 酸 浓 度 (m M)	PS 80: 蛋 白 质 摩 尔 比	酸 性 物 质 的 初 始 量 (%)	碱 性 物 质 的 初 始 量 (%)	主 要 型 的 初 始 量 (%)						
									6个 月 后 的 CE X 酸 性 变 化	12个 月 后 的 CE X 酸 性 变 化	6个 月 后 的 CE X 碱 性 变 化	12个 月 后 的 CE X 碱 性 变 化	6个 月 后 的 CE X 主 要 变 化	12个 月 后 的 CE X 主 要 变 化
157	6.4	50	25	125	1.5	23.9	6.8	69.3	8.5	17.4	7.1	3.4	-15.6	-20.8
162	6.2	50	25	125	0.7	24.0	6.9	69.1	4.4	12.8	10.8	8.6	-15.2	-21.4
158	6.3	50	25	125	1.5	24.8	5.5	69.7	7.2	--	4.9	--	-14.4	--
160	6.4	42	25	125	1.5	24.9	5.5	69.7	9.5	--	1.0	--	-14.4	--
147	6.7	45	25	125	2.1	24.9	4.7	70.4	14.8	--	3.6	--	-16.5	--
147	6.9	45	25	125	2.2	25.0	4.9	70.1	14.5	--	3.2	--	-17.9	--
153	6.7	46	25	125	1.5	24.8	5.5	69.7	14.7	--	0.3	--	-17.3	--
154	6.9	46	25	125	1.5	24.9	5.3	69.8	19.7	--	0.5	--	-20.2	--
170	6.5	50	25	125	1.0	25.7	4.6	69.7	10.8	--	4.4	--	-15.2	--
170	6.5	50	25	125	1.5	25.7	4.6	69.7	11.1	--	5.2	--	-16.4	--

[0261]

表9

160	6.5	50	25	125	1.5	26.3	7.0	66.7	11.8	--	-2.6	--	-11.9	--
-----	-----	----	----	-----	-----	------	-----	------	------	----	------	----	-------	----

蛋白质浓度 (mg/mL)	pH	组氨酸浓度 (mM)	柠檬酸盐浓度 (mM)	精氨酸浓度 (mM)	PS8 0: 蛋白质摩尔比	在5°C下相对面积%随时间的差异					
						6个月后的 CEX酸性变化	24个月后的 CEX酸性变化	6个月后的 CEX碱性变化	24个月后的 CEX碱性变化	6个月后的CEX 主要变化	24个月后的 CEX主要变化
157	6.4	50	25	125	1.5	0.2	0.6	2.3	-0.9	-2.5	0.3
162	6.2	50	25	125	0.7	-0.2	-0.7	4.3	2.2	-4.1	-1.5
158	6.3	50	25	125	1.5	0.0	--	1.9	--	-1.9	--
160	6.4	42	25	125	1.5	0.1	--	1.7	--	-1.8	--
147	6.7	45	25	125	2.1	1.7	--	1.7	--	-3.4	--
147	6.9	45	25	125	2.2	1.6	--	1.1	--	-2.7	--
153	6.7	46	25	125	1.5	1.7	--	0.4	--	-2.1	--
154	6.9	46	25	125	1.5	2.1	--	0.4	--	-2.4	--
170	6.6	50	25	125	1.0	0.9	--	1.6	--	-2.5	--

[0262]

	5											
170	6.	5	50	25	125	1.5	0.8	--	1.6	--	-2.5	--
160	6.	5	50	25	125	1.5	11.8	--	-2.6	--	-11.9	--

[0264] 实施例2

[0265] 稳定性

[0266] 测试四种不同抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂在十二个月的时程内的稳定性。pH为6.0-6.2的制剂显示比pH为6.3-6.4的制剂少约1%-2%主要物质(图12)。在5℃下,pH为6.3-6.4的制剂显示碱性或主要物质的变化小于1%。

[0267] 通过SEC测试十种不同抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂在十二个月的时程内的稳定性(表10)。具有60mg/mL蛋白质浓度且含有25mM柠檬酸盐的制剂在1年之后聚集体变化0.1%-0.2%,而含有160mg/mL蛋白质和25mM柠檬酸盐的制剂在1年内聚集体增加0.2%-0.3%。含有60mg/mL、110mg/mL或160mg/mL蛋白质、无柠檬酸盐的制剂的聚集体增加0.4%-0.6%。

[0268] 表10

[0269]

制剂 编号	蛋白质 浓度 (mg/m L)	pH	组氨酸浓 度(mM)	柠檬酸 盐浓度 (mM)	精氨酸 浓度 (mM)	PS80 摩尔 比	在5°C下1 年之后的 聚集体% 变化
1	62	6.41	50	25	125	0.7	0.11
2	60	6.35	50	0	125	1.5	0.50
3	157	6.44	50	25	125	1.5	0.23
4	161	6.3	50	0	125	0.7	0.56
5	60	6.19	50	25	125	1.5	0.16
6	110	6.03	50	0	125	0.7	0.39
7	162	6.19	50	25	125	0.7	0.26
8	160	6	50	0	125	1.5	0.44
9	165	6.28	0	40	125	1.5	0.30
10	160	6.3	0	40	125	1.0	0.33

[0270] 实施例3

[0271] 粘度

[0272] 施用药物制剂所需的注射力与制剂粘度有关。制备具有不同pH和不同蛋白质、精氨酸、组氨酸、柠檬酸盐、蔗糖及聚山梨醇酯80浓度的制剂。测试这些制剂的粘度。产生Ln(粘度)的统计模型。所述模型显示粘度主要受蛋白质浓度和pH影响(图13)。蔗糖、组氨酸和精氨酸也可对粘度具有轻微影响。在一些蛋白质制剂中,添加氯化钠以降低制剂粘度。然而,已知氯化钠对粘度的影响依赖于蛋白质和制剂。

[0273] 添加氯化钠至聚山梨醇酯80与蛋白质摩尔比为1.5且pH为6.4的含有140mg/mL维多珠单抗、125mM精氨酸、25mM组氨酸、25mM柠檬酸盐和聚山梨醇酯80的制剂中。NaCl对制剂粘度无任何影响。

[0274] 粘度对所测试各种注射器的注射力的影响显示于图16A和16B中。

[0275] 实施例4

[0276] 方法

[0277] 阳离子交换色谱(CEX)

[0278] 弱阳离子交换管柱上的磷酸盐/氯化钠梯度用于高效液相色谱系统中以分离抗 $\alpha 4$ $\beta 7$ 抗体制剂中的带电荷物质且测定抗体物质的电荷组成。酸性亚型在主要亚型之前洗脱且碱性亚型在主要亚型之后洗脱。

[0279] 使用CEX测定产生的维多珠单抗制剂的稳定性数据指示主要亚型%高于55.0%。

[0280] 毛细管等电聚焦(cIEF)

[0281] 使用iCE280全柱检测cIEF系统(Convergent Biosciences, Toronto, Ontario)进行cIEF。两性电解质的选择可如由制造商所推荐或可为可商购两性电解质的组合。适用组合是3-10与5-8PHARMALYTE™的混合物(GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

[0282] 使用cIEF测定产生的维多珠单抗制剂的稳定性数据指示主要亚型%是约53%,酸性物质%是约42%,并且碱性物质%是约5%。

[0283] 尺寸排阻色谱法(SEC)

[0284] 使用分析型SEC管柱(Tosoh Bioscience, LLC, King of Prussia, PA)进行SEC。移动相是磷酸盐缓冲生理食盐水溶液且在280nm下监测吸光度。

[0285] 使用SEC测定产生的维多珠单抗制剂的稳定性数据指示单体%是99.0%，聚集体%<0.5%且低分子量物质%<1.0%。

[0286] SDS-PAGE测定

[0287] 使用Invitrogen (Carlsbad, CA) Tris-甘氨酸凝胶(在还原条件下是4%-20%且在非还原条件下是4%-12%)进行SDS-PAGE。将复原抗体制剂样本于液体制剂缓冲液中稀释，随后以具有10% 2-巯基乙醇(还原样本缓冲液)或不具有2-巯基乙醇(非还原样本缓冲液)的Tris-甘氨酸SDS样本缓冲液(2×, Invitrogen) 1:2稀释。短暂加热样本且装载，以分子量标记物(Invitrogen)为对照。根据制造商说明书用胶状考马斯蓝(Invitrogen)染色凝胶。通过密度测定法分析蛋白质带以鉴定还原凝胶的重链和轻链%以及非还原凝胶的IgG%。

[0288] 结合功效

[0289] 使悬浮于含1% BSA的PBS、0.01%叠氮化钠中的HuT78细胞(人T细胞淋巴瘤细胞，美国菌种保藏中心，Manassas, VA)与初级测试抗体的连续稀释液接触。在冰上孵育之后，洗涤细胞且以荧光标记的二级抗体处理。在再洗涤之后，将细胞固定且悬浮于FACS试剂中以通过流动式细胞测量术(Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ)进行分析；也参见美国专利号7,147,851。

[0290] 水分(通过卡尔费休测定)

[0291] 用甲醇滴定剂以测定库仑(coulometric)卡尔费休水分。

[0292] 实施例5

[0293] 来自预填充有抗α4β7抗依制剂的注射器产品的聚硅氧的影响

[0294] 使用由含60-160mg/mL抗α4β7蛋白质的含有L-组氨酸、L-精氨酸盐酸盐、柠檬酸盐和聚山梨醇酯80的缓冲液组成的皮下制剂来研究聚硅氧对蛋白质制剂稳定性和容器/外壳属性的影响。在0.5mL填充量下进行研究。

[0295] 探究包括蛋白质浓度、聚山梨醇酯80与蛋白质摩尔比和喷涂于注射器筒上的聚硅氧的量的参数。各输入参数的范围显示于表11中。

[0296] 表11. 输入参数范围

[0297]

参数	低	高
蛋白质浓度(mg/mL)	100	160
聚山梨醇酯80:蛋白质比率	0	2
聚硅氧量(mg)	0.4	0.8

[0298] 使用实验设计来确定要研究的制剂组。合理制剂数目在6至8种制剂范围内。测试的制剂的一个实施例显示于表12中。

[0299] 表12

	轮次	蛋白质浓度(mg/mL)	PS80:蛋白质比率	PS80浓度(%)	聚硅氧含量(mg)
[0300]	1	100	1	0.087	0.8
	2	100	2	0.174	0.8
	3	160	0	0	0.8
	4	160	2	0.279	0.4
	5	100	0	0	0.4
	6	160	2	0.279	0.8
	7	100	1	0.087	0.4
	8	160	0	0	0.4
	9	100	0	0	0
[0301]	10	100	2	0.174	0
	11	160	0	0	0
	12	160	2	0.279	0

[0302] 可将一些对照添加至所述制剂组中且在几个选定时间点进行测试。

[0303] 在数个不同温度(例如5℃、25℃/60%RH、40℃/75%RH)下稳定置放这些制剂且在各个时间点(例如第0周、第1周、第2周、第4周、第8周、第12周、第6个月和第12个月)拉伸(pull)以进行测试。在第0周、第12周、第6个月及第12个月测试对照。

[0304] 在各稳定性时间拉伸进行的测试包括SEC、CEX、英斯特朗(Instron)、MFI和聚硅氧定量。测试1个注射器的英斯特朗,其中排出的物质用于SEC、CEX、注射力测量和微流成像(MFI)以及聚硅氧定量。

[0305] 实施例6

[0306] 分析填充有抗α4β7抗体制剂的预填充注射器组分

[0307] 这项研究探究各个注射器制造商、柱塞(塞子)弹性体材料和制剂中的PS80的量如何影响系统的机械性质和制剂的稳定性。

[0308] 建立探究3个不同注射器制造商、2种不同柱塞(塞子)材料类型和2个不同PS80与蛋白质摩尔比的实验设计。保持制剂的其余部分恒定在170mg/mL蛋白质、125mM精氨酸、50mM组氨酸、25mM柠檬酸盐和pH6.5下。这些预填充注射器上的针尺寸是27G1/2'或29G1/2"薄壁。进行的实验详述于表15中。

[0309] 实验的活性部分的实验设计输入值显示于下表13中,而常数显示于表14中。利用表13中所示的输入值来建立实验设计。

[0310] 实验清单显示于表10中。

[0311] 表13.活性制剂的DOE变量和水平

	变量	值		
[0312]	PS80:蛋白质摩尔比	1.0		1.5
	注射器制造商	A	B	C
	柱塞(塞子)类型	4432		4023, 经涂布

[0313] 表14.活性制剂的常数

[0314]

常数	值
蛋白质浓度(mg/mL)	170

精氨酸浓度 (mM)	125
组氨酸浓度 (mM)	50
柠檬酸盐浓度 (mM)	25
pH	6.5

[0315] 表15.实验详情

[0316]

轮次编号	注射器类型	柱塞 (塞子)	PS80
1	C	4432	1
2	B	4432	1
3	A	4023	1
4	C	4023	1
5	B	4023	1
6	A	4023	1.5
7	C	4023	1.5
8	B	4023	1.5

[0317] 将浓缩配制的抗 $\alpha 4\beta 7$ 制剂外加聚山梨醇酯80且稀释至170mg/mL。起始制剂的组成显示于下表16中。

[0318] 表16.起始制剂缓冲液详情

[0319]

蛋白质 (mg/ml)	总His (mM) 总柠檬酸盐 (mM)	Arg (mM)	pH
183	5025	125	6.48

[0320] 为了稀释物质以获得所需制剂组成,制备PS80于25mM柠檬酸盐、50mM组氨酸、125mM精氨酸 (pH6.48) 中的储备溶液。

[0321] 表17.储备溶液详情

[0322]

赋形剂	浓度
PS80 (%)	5

[0323] 制剂的稀释方案详述于表18中。

[0324] 表18.稀释详情

起始制剂 (μL)	含PS80之 His/Arg/柠檬酸盐缓冲液(μL)	50 mM组氨酸、125 mM精氨酸、25 mM柠檬酸盐 (pH 6.48)缓冲液	总体积 (μL)
27868.9	890.8	1240.3	30000.0
18579.2	890.8	530.0	20000.0

[0326] 基于稀释方案进行混配,并且应称重起始制剂,而其它储备溶液可按体积吸取。过滤制剂。将0.5mL制剂等分至尽可能多的1mL长的注射器中。通过加塞机塞住注射器,留有2-4mm气泡。在各时间点,一个注射器以针向下来储存且一个注射器横向储存。额外注射器以针向下来储存。

[0327] 在5°C、25°C和40°C下在第2周和一个月时测试注射器。起初进行分析测试 (外观、英斯特朗、pH、重量摩尔渗透浓度、密度、粘度、SEC、CEX和Brightwell) 且随后在25°C和40°C

下第2周时以及25℃下第4周时再进行分析测试。

[0328] 实施例7

[0329] 分析用于预填充有充 α 4 β 7抗体制剂的27G薄壁针注射器中的皮下容器外壳

[0330] 这项研究探究具有27G薄壁针的各个注射器模型和各个柱塞(塞子)制造商及模型如何影响系统的机械性质和制剂随时间的稳定性。

[0331] 这项研究探究预填充注射器中的抗 α 4 β 7皮下液体制剂的稳定性和注射器的机械性质如何受注射器制造商和用于具有27GTW针的注射器的柱塞(塞子)模型的影响。自此研究产生的数据可确定液体皮下抗 α 4 β 7制剂的容器/外壳组分。

[0332] 实验设计输入值显示于下表19中,而常数显示于表20中。利用表19中所示的输入值来建立实验设计。

[0333] 要进行的实验的清单显示于表21中。

[0334] 表19.活性制剂的DOE变量和水平

变量	值			
注射器制造商	A	B	C	
柱塞(塞子)类型	4432	4023, 经涂布	D	E

[0336] 表20.活性制剂的常数

[0337]

常数	值
蛋白质浓度 (mg/mL)	160
精氨酸浓度 (mM)	125
组氨酸浓度 (mM)	50
柠檬酸盐浓度 (mM)	25
PS80 (%)	02
pH	6.5

[0338] 表21.实验详情

[0339]

轮次编号	注射器	柱塞(塞子)
1	B	D
2	B	4432
3	A	4432
4	B	4023, 经涂布
5	A	D
6	C	4023, 经涂布
7	A	4023, 经涂布
8	C	D
9	C	4432
10	C	E

[0340] 将浓缩抗 α 4 β 7制剂外加聚山梨醇酯80且稀释至160mg/mL。起始制剂的组成显示于下表22中。

[0341] 表22.起始制剂缓冲液详情

[0342]	蛋白质(mg/ml)	总His (mM)	总柠檬酸盐(mM)	Arg (mM)	pH
[0343]	180	50	25	125	6.3

[0344] 为了稀释物质以获得所需制剂组成,制备PS80于25mM柠檬酸盐、50mM组氨酸和125mM精氨酸(pH6.3)中的储备溶液。

[0345] 表23.储备溶液详情

[0346]

赋形剂	浓度
含PS80 (%) 之His/Arg/柠檬酸盐缓冲液,pH6.3	1.68

[0347] 制剂的稀释方案详述于表24中。

[0348] 表24.稀释详情

[0349]	含起始制剂之His Arg柠檬酸盐缓冲液(mL)	含PS80之His/Arg/柠檬酸盐缓冲液(mL)	总体积(mL)
	78	10 (1.68%)	88

[0350] 基于稀释方案进行混配,并且应称重起始制剂,而其它储备溶液可按体积吸取。过滤制剂。将0.5mL制剂等分至尽可能多的1mL长的注射器中。通过加塞机塞住注射器,留有2-4mm气泡。对于各时间点,有一个注射器以针向下来储存(水平位置)。

[0351] 在5℃、25℃/60%RH和40℃/75%RH下在第1个月、第3个月、第6个月、第9个月(任选)、第12个月、第18个月和第24个月时测试注射器。

[0352] 在第1、3、6、9、12、18、24个月(5℃);第1、3、6、9、12、18个月(25℃);第1、3、6、9、12个月(40℃);和第1、3个月(40℃)时分析测试液体制剂(浓度、重量摩尔渗透浓度、pH、英斯特朗、MFI、SEC和/或CEX)。

[0353] 实施例8

[0354] 分析塑料预填充注射器中的皮下抗 α 4 β 7抗体制剂

[0355] 开始这项研究以研究使用塑料注射器作为抗 α 4 β 7抗体皮下制剂的容器/外壳系统。研究代表性抗 α 4 β 7抗体皮下制剂在候选塑料预填充注射器中的稳定性。从这项研究产生的数据有助于判断使用塑料注射器用于液体皮下抗 α 4 β 7抗体制剂的适用性。

[0356] 如下所示制备稳定性测试样本。在40℃/75%RH、25℃/60%RH和5℃的储存条件下进行稳定性测试。

[0357] 用表26中所示的液体皮下抗 α 4 β 7抗体制剂测试表25中的两种类型的塑料注射器和一种玻璃注射器(对照)。表27显示实验中待测试的各组样本的详情。

[0358] 表25.塑料注射器

[0359]

		1号样本 塑料注射器1	2号样本 塑料注射器2	3号样本 玻璃注射器 (对照)
注射器	供货商	F	B	A
	组分	注射器: 聚合物 针: 27 G(TW) 刚性针罩	注射器: 聚合物 针: 26 G(RW) 鲁尔(Luer)锁定端帽	注射器: 玻璃 针: 27 G(TW) 刚性针罩
	硅涂层	无	有	有
柱塞	供货商	F	F	←
	产品描述	1 mL材料A	1 mL材料B	←
	硅涂层	无	有	←

[0360] 表26. 抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体皮下制剂 (pH6.5)

[0361]

组分	组成
抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体	160mg/mL
精氨酸	125mM
组氨酸	50mM
柠檬酸盐	25mM
PS80 (蛋白质摩尔比)	1.5 (0.2w/v%)

[0362] 表27. 样本详情

[0363]

样 本	塑料 注射	蛋白质	Arg (MW:1	His (MW:	柠檬酸 盐	PS 80	pH
(MW:1500			(MW:1309.6				

[0364]

编 号	器供 货商	00)		74.20) (mM)	155.15) (mM)	(MW:2 10.14) (mM)	8)		
		(mg/ ml)	(m M)				(w/v %)	蛋白 质摩 尔比	
1	F	160	1.0 67	125	50	25	0.21	1.5	6.5
2	B	160	1.0 67	125	50	25	0.21	1.5	6.5
3(对照)	A	160	1.0 67	125	50	25	0.21	1.5	6.5

[0365] 先前制备的液体皮下抗 $\alpha 4\beta 7$ 制剂用于这项研究。过滤制剂。取样用于质测量试的经过滤溶液作为“填充前”样本 (Appearance, MFI, DLS)。将0.5mL制剂等分至1mL塑料注射器中。通过真空加塞机塞住注射器。注射器以针向下来储存。

[0366] 进行初始检查以测量pH、重量摩尔渗透浓度、密度、粘度和蛋白质浓度。在40℃下1周后; 40℃下2周后; 5℃、25℃和40℃下1个月后; 5℃和25℃下3个月后; 5℃和25℃下6个月后; 5℃和25℃下9个月后; 以及5℃和25℃下12个月后进行分析测试 (外观、SEC (聚集体、单体、LMW)、CEX (酸性、主要、碱性)、滑动力、MFI、DLS和/或重量)。

[0367] 在5℃和25℃下第1个月、第3个月、第6个月、第9个月和第12个月时采集样本。在40

℃下第1周、第2周和第1个月时采集样本。

[0368] 实施例9:

[0369] 在5℃和25℃下在可已包括第0、1、3、6和12个月的各个时间点分析样本的外观、注射力、SEC、CEX和微流成像。如通过SEC和CEX测量的制剂的稳定性类似于实施例1和2中论述的稳定性。对于注射力测试,测量滑动力(表28)。统计模型确定影响滑动力的唯一重要因素是注射器制造商,其中A的滑动力比B大,B大于C(图17)。在5℃下12个月和25℃下6个月内的注射器滑动力变化小于10N,但大多小于5N

[0370] 表28

[0371]

轮次编号	注射器制造商	针尺寸	柱塞(塞子)类型	PS80:蛋白质摩尔比	初始滑动力(N)
1	C	27G	D	1	19.2
2	B	27G	D	1	22.9
3	A	29GTW	E	1	25.0
4	C	27G	E	1	18.5
5	B	27G	E	1	22.7
6	A	29GTW	E	1.5	28.8
7	C	27G	E	1.5	18.7
8	B	27G	E	1.5	23.7

[0372] 实施例10

[0373] 分析用于填充有抗α4β7抗体制剂的27G薄壁针注射器中的预填充注射器组分

[0374] 这项研究探究具有27G薄壁针的各个注射器制造商和各个柱塞(塞子)制造商以及弹性体材料如何影响预填充注射器系统的机械性质和制剂随时间的稳定性。

[0375] 用27G1/2"薄壁针和含有160mg/mL蛋白质、125mM精氨酸、50mM组氨酸、25mM柠檬酸盐、0.2%PS80 (pH6.5)的制剂测试3个不同注射器制造商和4种不同柱塞(塞子)模型。所产生和测试的所有样本都显示于表29中。

[0376] 表29.实验详情

[0377]

轮次编号	注射器	柱塞(塞子)
1	B	F
2	B	D
3	A	D
4	B	E
5	A	F
6	C	E
7	A	E
8	C	F
9	C	D
10	C	G

[0378] 在5℃、25℃和40℃下在可已包括第0、1、3、6和12个月的各个时间点分析样本的外观、注射力、SEC、CEX和微流成像。如通过SEC和CEX测量的制剂的稳定性类似于实施例1和2中论述的稳定性。对于注射力测试,测量脱开力和滑动力。起始时间点时的结果显示于表30

中。

[0379] 表30

[0380]

轮次 编号	注射器 制造商	柱塞(塞 子)类型	初始 滑动力(N)	初始 脱开力(N)	在5°C下 12个月时 的脱开力 (N)	在25°C下 12个月时 的脱开力 (N)	在40°C下 12个月时 的脱开力 (N)
1	B	F	12.0	4.0	3.8	12.9	28.7
2	B	D	11.9	3.9	4.6	12.4	36.0
3	A	D	7.0	4.0	6.5	5.1	6.4
4	B	E	13.9	4.5	4.7	5.8	17.2
5	A	F	5.7	4.1	3.0	17.5	23.9
6	C	E	6.7	4.1	5.0	5.8	11.4
7	A	E	7.9	7.6	4.3	10.4	6.1
8	C	F	6.3	4.2	4.1	15.0	33.3
9	C	D	5.9	4.8	3.9	4.4	10.0
10	C	G	7.2	4.6	6.1	9.8	13.0

[0381] 统计模型显示注射器制造商A与C类似且滑动力比制造商B低,而柱塞(塞子)E的滑动力比其它柱塞(塞子)略高。

[0382] 一般而言,初始脱开力在测试的所有样本之间都类似。

[0383] 在5°C、25°C和40°C下12个月内,滑动力不显著变化。然而,具有柱塞(塞子)F的注射器的脱开力在25°C和40°C下截至12个月时有所增加。

[0384] 实施例11

[0385] 分析预填充注射器中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂

[0386] 这项研究确定不同水平的蛋白质浓度、聚山梨醇酯80浓度、柠檬酸盐浓度和pH如何影响预填充注射器形式中的抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂。

[0387] 在JMP中用两个水平的蛋白质浓度(60至160mg/mL)、pH(6.0至6.3)、聚山梨醇酯80:蛋白质摩尔比(0.723至1.5)和柠檬酸盐浓度(0至25mM)的分级析因(fraction factorial)产生实验设计的一部分。这些制剂具有恒定值的组氨酸浓度(50mM)和精氨酸(125mM)(制剂1-8)。添加这些制剂的具有25mM组氨酸的变化形式(制剂9-10)。

[0388] 开发另一组制剂以探究不存在组氨酸且仅柠檬酸盐充当缓冲剂的制剂(制剂11-16)。所探究的所有制剂的输入水平都显示于表31中。用于所有制剂的常数都显示于表32中。

[0389] 表31.DOE变量和水平

[0390]

变量	标称值	
	低	高
蛋白质浓度(mg/mL)	60	160
pH	6.0	6.3
PS80:蛋白质摩尔比	0.723	1.5
柠檬酸盐浓度(mM)	0	40
组氨酸浓度(mM)	0	50

[0391] 表32.常数

[0392]

常数	值
精氨酸浓度 (mM)	125

[0393] 表33列出待测试的制剂。

[0394] 表33. 制剂详情

[0395]

制剂 编号	蛋白 质 (mg/ ml)	蛋白质 (mM)	His (m M)	Arg (m M)	PS 80 %	pH	PS80: 蛋白质 摩尔比	抗氧 化剂	抗氧 化剂 浓度 (mM)
1	60	0.400	50	125	0.038	6.3	0.723	柠檬 酸	25
2	60	0.400	50	125	0.079	6.3	1.5	柠檬 酸	0
3	157	1.047	50	125	0.206	6.3	1.5	柠檬 酸	25

[0396]

4	160	1.067	50	125	0.101	6.3	0.723	柠檬 酸	0
5	60	0.400	50	125	0.079	6.0	1.5	柠檬 酸	25
6	110	0.733	50	125	0.069	6.0	0.723	柠檬 酸	0
7	160	1.067	50	125	0.101	6.0	0.723	柠檬 酸	25
8	160	1.067	50	125	0.210	6.0	1.5	柠檬 酸	0
9*	160	1.067	25	125	0.101	6.0	0.723	柠檬 酸	25
10*	160	1.067	25	125	0.140	6.0	1	柠檬 酸	25
11	160	1.067	0	125	0.101	6.3	0.723	柠檬 酸	40
12	160	1.067	0	125	0.210	6.3	1.5	柠檬 酸	40
13	60	0.400	0	125	0.079	6.3	1.5	柠檬 酸	40
14*	160	1.067	0	125	0.210	6.1	1.5	柠檬 酸	40
15*	160	1.067	0	125	0.210	6.6	1.5	柠檬 酸	40
16*	160	1.067	0	125	0.140	6.3	1	柠檬 酸	40

[0397] 从含有抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体的起始储备制剂产生各制剂且用各种赋形剂储备溶液稀释。为了实现合理稀释体积,所用抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体储备溶液显示于表34中。进行两种不同TFF操作以获得制剂TFF1和2。一部分TFF1用于透析中以实现标记为“透析”的制剂。

[0398] 表34.起始制剂缓冲液详情

	起始制剂	蛋白质 (mg/ml)	总His (mM)	总柠檬酸 盐(mM)	Arg (mM)	pH
[0399]	TFF 1	192.1	50	0	125	6.1
	TFF 2	206.1	0	40	125	6.3
	透析	169.65	25	25	125	6.0

[0400] 为了稀释物质以获得所需制剂组成,在由表35指定的浓度下制备各赋形剂于水中的储备溶液。

[0401] 表35.储备溶液详情

[0402]

赋形剂	浓度
组氨酸 (mM)	220
精氨酸盐酸盐 (mM)	625
PS80 (%)	2.5
组氨酸盐酸盐 (mM)	600
柠檬酸 (mM) (pH6.3)	1500
柠檬酸 (mM) (pH6.0)	1500
柠檬酸盐 (mM)	600
柠檬酸钠 (mM)	800

[0403] 制剂的稀释方案详述于表36和37中。

[0404] 表36.稀释详情

[0405]

	起始制 剂(μL)	起始制 剂(mg)	His (μL)	His*H Cl (μL)	Arg (μL)	柠檬 酸盐 溶液 (μL)	PS80 (μL)	WFI (μL)
1	4685.0 6	4961.01	1612. 2	268.4	2063.0	250	227.3	5894.0
2	4685.0 6	4961.01	1612. 2	268.4	2063.0	0	471.6	5899.7
3	12259. 2	12981.3 1	724.1	0.0	548.2	250.0	1234. 0	0.0
4	12493. 49	13229.3 6	696.7	0.0	501.3	0	606.2	702.4
5	4685.0 6	4961.01	1002. 8	491.9	2063.0	250	471.6	6035.7
6	8589.2 8	9095.18	545.0	334.4	1282.1	0	416.7	3832.4
7	12493. 49	13229.3 6	87.2	176.9	501.3	250	606.2	884.9
8	12493. 49	13229.3 6	87.2	176.9	501.3	0	1257. 6	483.5
9	12260. 8	12941.3 0	38.2	16.8	147.8	12.3	525.3	0.0
10	12260. 8	12941.3 0	38.2	16.8	147.8	12.3	726.6	0.0

[0406] 表37. 稀释详情

	起始制 剂(μL)	起始制剂 (mg)	柠檬 酸盐 (μL)	柠檬酸 钠(μL)	Arg (μL)	PS80 (μL)	WFI (μL)	
[0407]	11	9315.87	9944.69	8.3	128.0	536.8	484.9	1526.1
	12	9315.87	9944.69	8.3	128.0	536.8	1006.1	1005.0
	13	3493.45	3729.26	30.5	402.5	1701.3	377.3	5995.0
	14	5822.42	6215.43	22.0	67.4	335.5	628.8	623.9
	15	5822.42	6215.43	0.0	300.0	335.5	628.8	413.3
	16	5822.42	6215.43	5.2	80.0	335.5	419.2	837.7

[0408] 基于稀释方案进行混配,并且称重起始制剂,而其它储备溶液按体积吸取。过滤制剂。将0.5mL制剂等分至尽可能多的1mL长的注射器中。通过加塞机塞住注射器。注射器以针向下来储存。

[0409] 在初始;以及在40℃下第1周;40℃下第2周;25℃和40℃下第1个月;5℃和25℃下第2个月;5℃和25℃下第3个月;5℃和25℃下第6个月;5℃和25℃下第9个月;及5℃和25℃下第12个月时分析测试液体制剂(外观、pH、重量摩尔渗透浓度、密度、DLS、SEC、CEX和/或Brightwell)。

[0410] 也进行根据表38的特定制剂拉伸。

[0411] 表38:特定制剂拉伸

制 剂	温 度	第1 周	第2 周	第1 个月	第2 个月	第3 个月	第6 个月	第9 个月	第12 个月	额外
1	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
2	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
3	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
4	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
5	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
6	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
[0412]	7	5	--	--	X	X	X	X	X	0
	8	5	--	--	X	X	X	X	X	1
	9	5	--	--	--	--	--	--	--	3
	10	5	--	--	X	X	X	--	X	0
	11	5	--	--	--	--	--	--	--	5
	12	5	--	--	X	--	--	--	--	4
	13	5	--	--	--	--	--	--	--	5
	14	5	--	--	X	--	--	--	--	1
	15	5	--	--	--	--	--	--	--	2
	16	5	--	--	X	--	--	--	--	1

[0413]

1	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
2	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
3	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
4	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
5	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
6	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
7	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
8	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
9	25	--	--	X	--	--	--	--	--	3
10	25	--	--	X	X	--	X	--	--	0
11	25	--	--	X	--	--	--	--	--	5
12	25	--	--	X	X	--	--	--	--	4
13	25	--	--	X	--	--	--	--	--	6
14	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
15	25	--	--	X	--	--	--	--	--	2
16	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
1	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
2	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
3	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
4	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
5	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
6	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
7	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
8	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
9	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
10	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
11	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
12	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
13	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
14	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
15	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
16	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0

[0414] 实施例12

[0415] 测试含有160mg/mL蛋白质、50mM组氨酸、25mM柠檬酸盐、125mM精氨酸(pH6.5)的制剂在玻璃注射器或两种不同COP塑料注射器中的稳定性。在5℃和25℃下12个月之后,聚集体和单体的量在塑料注射器与玻璃注射器之间相当。

[0416] 表39

[0417]

制剂 编号	PS80: 蛋白质	注射 器材	在5℃下12个 月之后的	在25℃下12 个月之后的	在5℃下 12个月之	在25℃下 12个月之
----------	--------------	----------	-----------------	------------------	---------------	----------------

[0418]

	摩尔比	料	SEC聚集体 变化(%)	SEC聚集体 变化(%)	后的单体 量(%)	后的单体 量(%)
1	1.5	COP 制造商1	0.2	1.0	98.3	96.8
2	1.5	COP 制造商2	0.2	1.6	98.3	96.9
3	1.5	玻璃	0.2	1.4	98.4	96.8
4	1	玻璃	0.2	1.6	98.3	96.8

[0419] 实施例13:通过皮下和肌内注射施用的维多珠单抗的生物可用性

[0420] 完成通过皮下及肌内注射向健康男性受试者施用的维多珠单抗的生物可用性的第1期研究。在研究中招募总共42个健康男性。将所述受试者分成各自具有14个受试者的三组(皮下、肌内和静脉内施用)。在一天内向受试者施用180mg维多珠单抗。从60mg/ml抗体于50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH6.3)中的冻干制剂复原所述剂量。对于肌内和皮下受试者,将剂量分成各自1.5ml的两次注射。对血液取样以测定血浆维多珠单抗浓度且测定各组受试者中的维多珠单抗的生物可用性。

[0421] 既未报道严重不利事件或重大感染、临床显著异常、阳性主观/客观RAMP检核表,也未报道临床上显著ECG研究结果。

[0422] 完成PK/PD建模和模拟以确定产生与静脉内给药类似的暴露量以维持这个所需血清浓度处于谷底含量的血管外给药剂量和方案。

[0423] 吸收曲线(图18)显示肌内给药的浓度与皮下给药的浓度大体上重叠。这些施用途径的吸收曲线不存在明显总体差异。维多珠单抗的绝对生物可用性在SC注射之后约为75%且在IM注射之后约为80%。

[0424] 实施例14.对皮下给药方案建模

[0425] 完成PK/PD建模和模拟以确定产生与静脉内给药类似的暴露量以维持某些血清浓度处于谷底含量的血管外给药剂量和方案。

[0426] 最终组合数据集(IV、SC和IM数据)显示就清除率(CL)和中心分布体积(V2)、外周分布体积(V3)、血管外途径依赖性吸收速率常数(KA)以及血管外剂量的相对生物可用性(相较于静脉内施用)(F)而言加以参数化的二室线性模型。CL、V2和V3包括IIV项,其中体重是通过异速生长效应影响CL和V3的唯一共变量。

[0427] 通过靴带式参数估计、可见预测性检查和拟合良好性曲线证明模型具有可接受性和可预测性。对模型的分析鉴定体重为维多珠单抗的PK的预测因子,其中PK的可变性归因于受试者之间和受试者组分内的可变性。

[0428] 一旦证明模型适用于模拟,即进行模拟以评估施用途径(IV、IM或SC)对稳态谷底浓度的影响,并且评估给药频率(每周、每2周、每4周和每8周)对稳态谷底浓度的影响。基于这些值以及在IM和SC施用之后维多珠单抗的相对生物可用性(F=69.5%),选择剂量以实现与IV剂量类似的谷底浓度。

[0429] 模拟将剂量和方案建模以匹配静脉内诱导和维持方案。目标是暴露量(血清药物浓度-时间曲线下面积(AUC))与谷底药物浓度两者。表4043提供模拟结果。

[0430] 表40.匹配在第0-6周期间IV AUC的诱导方案

[0431]

途径	剂量	频率
IV	300mg	第0周和第2周
SC	485mg	第0周和第2周
SC	160mg	每隔一天 (6个剂量)
SC	>160mg	每周 (6个剂量)

[0432] 表41.匹配第0-6周IV谷底浓度的诱导方案

[0433]

途径	剂量	频率
IV	300mg	第0周和第2周
SC	>160mg	第0周和第2周
SC	100mg	每周 (6个剂量)
SC	160mg	每隔一天 (持续2周)

[0434] 表42.匹配每4周300mg IV剂量的维持方案

频率	途径	匹配4周IV稳态谷底浓度的剂量	匹配4周IV AUC的剂量
每4周一次	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
每2周一次	IV	115	150
	IM	165	216
	SC	165	216
每周	IV	50	75
	IM	72	108
	SC	72	108

[0436] 表43.匹配每8周300mg IV剂量的维持方案

频率	途径	匹配8周IV稳态谷底浓度的剂量	匹配8周IV AUC的剂量
每8周一次	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
每4周一次	IV	90	150
	IM	125	216
	SC	125	216
每2周一次	IV	35	75
	IM	50	108
	SC	50	108
每周	IV	15	37.5
	IM	22	54
	SC	22	54

[0438] 实施例15:第2a期多剂量研究

[0439] 第2a期多剂量研究可评估在通过皮下施用途径施用多个剂量的维多珠单抗之后,维多珠单抗的安全性、可耐受性和稳态PK,并且评估皮下方案相较于静脉内方案的相对生

物可用性。可评估HAHA和中和性HAHA的产生以及多个剂量的维多珠单抗在皮下施用之后对PD的影响。

[0440] 部分Mayo计分为1至12的溃疡性结肠炎患者和CDAI大于150的克罗恩氏病患者可包括在研究中。各组可接受第0周和第2周时IV施用维多珠单抗(300mg)的诱导方案,随后接受以下任一维持方案:

[0441] 在第6-22周每4周IV施用维多珠单抗(300mg)

[0442] 在第6-22周每8周IV施用维多珠单抗(300mg)

[0443] 在第6-22周每周SC施用维多珠单抗(108mg)

[0444] 在第6-22周每2周SC施用维多珠单抗(108mg)

[0445] 在第6-22周每3周SC施用维多珠单抗(165mg)。

[0446] 可在第1天在给药之前且随后再在第1(12小、时)、2、3、5、8、15、29、43、127、127(12小时)、128、129、131、134、141和155天收集样本以评估PK和PD。

[0447] 实施例16:维多珠单抗用于治疗IBD的长期临床经历

[0448] 完成第2期公开标签安全性扩展研究以评估维多珠单抗的长期药物动力学(PK)、药效学(PD)、安全性和功效。患者年龄是18至75岁,并且先前已参与溃疡性结肠炎患者的初期PK/PD/安全性研究或已在筛选的36个月内具有内窥镜检查和/或组织病理学和/或放射学证实的IBD症状持续至少2个月。

[0449] 所有患者都接受以下静脉内给药方案:在第1、15和43天施用2mg/kg或6mg/kg维多珠单抗(5mg/mL抗体、20mM柠檬酸盐/柠檬酸、125mM氯化钠、0.05%聚山梨醇酯80,pH6.0(长期储存于-70℃且储存于-20℃多达3个月)),随后每8周一个剂量,持续多达总共78周。患者是未治疗的溃疡性结肠炎或克罗恩氏病患者,或已参与初期临床试验的溃疡性结肠炎患者。

[0450] 使用功效/生活质量(QoL)、部分Mayo计分(PMS)、克罗恩氏病活动性指数(CDAI)和炎性肠病问卷(IBDQ)来评估研究结果。

[0451] PK结果

[0452] 平均输注前维多珠单抗浓度与剂量成比例,并且在整个研究期间保持稳定和可检测。

[0453] PD结果

[0454] 在所有剂量水平下在整个研究期间受体(ACT-1+[CD4+CD45RO HIGH]%和MADCAM+[CD4+CD45ROHIGH]%)几乎完全受抑制。

[0455] 部分Mayo计分

[0456] 未治疗的溃疡性结肠炎患者(5.4)的基线平均PMS比溃疡性结肠炎滚动(rollover)患者(2.3)高。截至第43天,滚动溃疡性结肠炎患者与未治疗的溃疡性结肠炎患者的平均PMS均显示显著降低。截至第155天,两组的平均计分类似。平均PMS继续降低直至第267天,并且此后平稳。

[0457] 克罗恩氏病活动性指数

[0458] CD患者的平均CDAI从基线时的294.6降低至第43天时的237.7,并且继续降低直至第155天(156.1)。

[0459] IBDQ

[0460] 溃疡性结肠炎滚动患者在基线时具有最高平均IBDQ计分。截至第43天,平均IBDQ计分在所有三个疾病组中都增加。平均IBDQ计分在所有3个疾病组中都继续随时间增加,对于克罗恩氏病患者,在第155天时达到最大,并且对于未治疗的溃疡性结肠炎患者和溃疡性结肠炎滚动患者,在第491天时达到最大。

[0461] C反应性蛋白

[0462] 溃疡性结肠炎滚动患者与克罗恩氏病患者均显示平均CRP含量降低直至第155天且随后平稳。未治疗的溃疡性结肠炎患者在基线时的平均CRP含量低于溃疡性结肠炎滚动患者(2.28对7.09)。未治疗的溃疡性结肠炎患者的平均CRP含量在评估的所有时间点都保持相对恒定。

[0463] 其它安全性结果

[0464] 在研究期间未报道全身机会性感染(包括PML)。一个患者在单一时间点被测试为JC病毒血症阳性,但在所有其它时间点都为JCV阴性。72个患者中有3个(4%)具有阳性HAHA结果(其中两个是短暂性阳性)。研究显示无肝毒性、淋巴球增多症或淋巴球减少症或任何其它药物相关实验室变化的迹象。

[0465] 结论

[0466] 以2.0mg/kg或6.0mg/kg每8周一次施用维多珠单抗持续多达78周实现目标受体饱和,与疾病活动性的持久平均降低和IBDQ计分提高相关,通常是安全且充分耐受的,并且显示免疫原性可接受。

[0467] 实施例17:患有中度至重度活动性溃疡性结肠炎的患者的反应和缓解的诱导和维持

[0468] 设计包括两个随机化双盲多中心研究的单一试验以评估患有中度至重度活动性溃疡性结肠炎的患者的反应和缓解的诱导和维持。人口资料和基线疾病特征在所有治疗组之间都相当。

[0469] 使用静脉内施用的诱导研究将安慰剂与维多珠单抗(在从60mg/mL抗体于50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH6.3)中的冻干制剂复原的300mg剂量下)进行比较,其中终点是在2个剂量的维多珠单抗后第6周时。

[0470] 使用与诱导研究相同的制剂和施用途径的维持研究将安慰剂与每四周给药的维多珠单抗以及安慰剂与每八周给药的维多珠单抗进行比较。这项研究的终点是在第52周时分析诱导反应者群体。

[0471] 在研究期间收集血液样本以测量维多珠单抗的浓度。在诱导期结束时维多珠单抗的平均血清浓度是20μg/mL至30μg/mL。30分钟静脉内输注300mg剂量施用之后的稳态下平均维多珠单抗谷底血清浓度对于每8周1次方案(8周方案)在9μg/mL至13μg/mL之间且对于每4周1次方案(4周方案)在35μg/mL至40μg/mL之间。在输注结束时,维多珠单抗中值血浆浓度对于每8周1次方案在98μg/mL与101μg/mL之间且对于每4周1次方案在约129μg/mL与137μg/mL之间。

[0472] 对诱导和维持研究的反应的概述提供于表44-47中。相较于安慰剂,在第6周时,显著更大比例的维多珠单抗治疗患者实现临床反应、缓解和粘膜愈合(表44)。诱导期意图治疗群体中有39%遭遇先前抗TNFα失败。在遭遇先前抗TNF失败的患者与无先前抗TNF暴露的患者中,维多珠单抗患者的临床反应和缓解率均高于安慰剂患者。在直至第6周的初步分析

中,安慰剂组中不利事件(AE)、严重AE和导致研究中止的不利事件的比率高于维多珠单抗组。相较于安慰剂患者,显著更大比例的维多珠单抗患者在第52周时实现临床缓解、粘膜愈合和无皮质类固醇缓解,并且实现持久反应和缓解(表45)。维持研究群体中有32%遭遇先前抗TNF α 失败。在TNF失败患者与未经TNF处理患者中,维多珠单抗的临床缓解和持久临床反应率均大于安慰剂。在第0-52周中,在安全性群体(N=895)中,不利事件(AE)、严重AE和严重感染的比率在维多珠单抗组与安慰剂组之间类似。在维多珠单抗组中未观察到机会性感染或肠道感染的比率增加。

[0473] 表44:诱导研究结果-主要和关键次要终点

[0474]

功效终点	安慰剂	维多珠单抗	差异/RR	P值
临床反应(%)	25.5%	47.1%	21.7%/1.8	<0.0001
临床缓解(%)	5.4%	16.9%	11.5%/3.1	0.0010
粘膜愈合(%)	24.8%	40.9	16.1%/1.6	0.0013

[0475] 表45:维持研究结果-主要和关键次要终点

功效终点	安慰剂 N=126	VDZ Q8 N=122	VDZ Q4 N=125	差异/RR Q8对安慰剂 Q4对安慰剂	P值
临床缓解(%)	15.9	41.8	44.8	26.1/2.7 29.1/2.8	<0.0001 <0.0001
持久反应(%)	23.8	56.6	52.0	32.8/2.4 28.5/2.2	<0.0001 <0.0001
粘膜愈合(%)	19.8	51.6	56.0	32.0/2.6 36.3/2.8	<0.0001 <0.0001
持久缓解(%)	8.7	20.5	24.0	11.8/2.4 15.3/2.8	0.0090 0.0011
无皮质类固醇缓解(%)	13.9 n=72	31.4 n=70	45.2 N=73	17.6/2.3 31.4/3.3	0.0133 <0.0001

[0477] 表46:诱导研究:ITT群体中遭遇先前抗TNF- α 拮抗剂失败的患者和无抗TNF暴露的患者在第6周时的临床反应和缓解

遭遇先前抗TNF- α 拮抗剂失败的患者(39%)				
终点	安慰剂 N=63	维多珠单抗 N=82	差异	95% CI
临床反应(%)	20.6	39.0	18.4	3.9, 32.9
临床缓解(%)	3.2	9.8	6.6	-9.8, 22.8
无抗TNF- α 拮抗剂暴露的患者(55%)				
	安慰剂 N=76	维多珠单抗 N=130	差异	95% CI
临床反应(%)	26.3	53.1	26.8	13.7, 39.9
临床缓解(%)	6.6	23.1	16.5	2.4, 30.2

[0479] 表47:在第52周时的临床缓解和持久临床反应:ITT群体中遭遇先前抗TNF- α 拮抗剂失败的患者或无抗TNF- α 拮抗剂暴露的患者

[0480]

遭遇先前抗TNF- α 拮抗剂失败的患者(32%)					
终点	安慰剂 N=38	VDZ 每8周1次 N=43	VDZ 每4周1次 N=40	差异 每8周1次对安 慰剂 每4周1次对安 慰剂	95% CI
临床缓 解(%)	5.3	37.2	35.0	31.9 29.7	10.3, 51.4 7.4, 49.4
持久临 床反应 (%)	15.8	46.5	42.5	30.7 26.7	11.8, 49.6 7.5, 45.9

[0481]

无抗TNF- α 拮抗剂暴露的患者(60%)					
	安慰剂 N=79	VDZ 每8周1次 N=72	VDZ 每4周1次 N=73	差异 每8周1次对安 慰剂 每4周1次对安 慰剂	95% CI
临床缓 解(%)	19.0	45.8	47.9	26.8 29.0	12.4, 41.2 14.6, 43.3
持久临 床反应 (%)	26.6	65.3	56.2	38.7 29.6	24.0, 53.4 14.6, 44.6

[0482] 实施例18:患有中度至重度活动性克罗恩氏病的患者的反应和缓解的诱导和维持

[0483] 设计包括两个随机化双盲多中心研究的单一试验以评估患有中度至重度活动性克罗恩氏病的患者的反应和缓解的诱导和维持。人口资料和基线疾病特征在所有治疗组之间都相当。

[0484] 使用静脉内施用的诱导研究将安慰剂与维多珠单抗(在从60mg/mL抗体于50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH6.3)中的冻干制剂复原的300mg剂量下)进行比较,其中终点是在2个剂量的维多珠单抗后第6周时。

[0485] 使用与诱导研究相同的制剂和施用途径的维持研究将安慰剂与每四周给药的维多珠单抗以及安慰剂与每八周给药的维多珠单抗进行比较。这项研究的终点是在第52周时分析诱导反应者群体。

[0486] 惊人的是,这项研究显示每4周1次组和每8周1次组产生极类似结果。对诱导和维持研究的反应的概述提供于表48-51中。相较于安慰剂,显著更大比例的维多珠单抗治疗患者实现临床缓解和反应增强(表48)。在遭遇先前抗TNF失败的患者与无先前抗TNF暴露的患者中,维多珠单抗患者的临床缓解和反应增强率均高于安慰剂患者。不利事件(AE)、严重AE和严重感染的比率在维多珠单抗组与安慰剂组之间类似。在维多珠单抗组中未观察到机会性感染或肠道感染的比率增加。

[0487] 表48:诱导研究结果-主要和次要终点

[0488]	终点	安慰剂 N=148	维多珠单抗 N=220	调整差异/RR	P值
	临床缓解(%)	6.8%	14.5%	7.8%/2.1	0.0206
	增强反应(%)	25.7%	31.4%	5.7%/1.2	0.2322
	平均CRP变化($\mu\text{g/mL}$)	-3.6 N=147	-2.9 N=220		0.9288

[0489] 表49: 维持研究结果-主要和关键次要终点

[0490]	功效终点	安慰剂 N=153	VDZ Q8 N=154	VDZ Q4 N=154	调整差异/RR Q8对安慰剂 Q4对安慰剂	P值
	临床缓解(%)	21.6	39.0	36.4	17.4/1.8 14.7/1.7	0.0007 0.0042
	增强反应(%)	30.1	43.5	45.5	13.4/1.4 15.3/1.5	0.0132 0.0053
	无皮质类固醇缓解(%)	15.9 N=82	31.7 N=82	28.8 N=80	15.9/2.0 12.9/1.8	0.0154 0.0450
	持久缓解(%)	14.4	21.4	16.2	7.2/1.5 2.0/1.1	0.1036 0.6413

[0491] 表50: ITT群体中遭遇先前抗TNF- α 拮抗剂失败的患者和无抗TNF暴露的患者在第6周时的临床缓解和增强反应

[0492]	遭遇先前抗TNF- α 拮抗剂失败的患者(48%)				
	终点	安慰剂 N=70	维多珠单抗 N=105	差异	95% CI
	临床缓解(%)	4.3	10.5	6.2	(-9.1, 21.3)
	增强反应(%)	22.9	23.8	1.0	(-11.8, 13.7)
	无抗TNF- α 拮抗剂暴露的患者(50%)				
		安慰剂 N=76	维多珠单抗 N=130109	差异	95% CI
	临床缓解(%)	9.2	17.4	8.2	(-1.4, 17.9)
	增强反应(%)	30.3	42.2	11.9	(-1.9, 25.8)

[0493] 表51: 在第52周时的临床缓解和增强反应: ITT群体中遭遇先前抗TNF- α 拮抗剂失败的患者或不具有抗TNF- α 拮抗剂暴露的患者

[0494]

遭遇先前抗TNF- α 拮抗剂失败的患者(51%)					
终点	安慰剂 N=78	VDZ 每8周1次 N=82	VDZ 每4周1次 N=77	差异 每8周1次对安慰剂 每4周1次对安慰剂	95% CI
临床缓解(%)	12.8	28.0	27.3	15.2 14.5	(3.0, 27.5) (2.0, 26.9)
增强反应(%)	20.5	29.3	37.7	8.8 17.1	(-4.6, 22.1) (3.1, 31.2)
无抗TNF- α 拮抗剂暴露的患者(45%)					
	安慰剂 N=71	VDZ 每8周1次 N=66	VDZ 每4周1次 N=71	差异 每8周1次对安慰剂 每4周1次对安慰剂	95% CI
临床缓解(%)	26.8	51.1	46.5	24.8 19.7	(8.9, 40.6) (4.2, 35.2)
增强反应(%)	38.0	60.6	53.5	22.6 15.5	(6.3, 38.9) (-0.7, 31.7)

[0495] 实施例19:患有中度至重度活动性克罗恩氏病的患者的反应和缓解的诱导

[0496] 完成随机化双盲安慰剂对照多中心研究以评估在300mg剂量下的维多珠单抗(从60mg/mL抗体于50mM组氨酸、125mM精氨酸、0.06%聚山梨醇酯80、10%蔗糖(pH6.3)中的冻干制剂复原)在TNF α 拮抗剂失败患者中在第6周时(在2个剂量-第0周和第2周之后)和在第10周时(在3个剂量之后)的诱导效应。研究由416个患者组成,其中75%遭遇TNF α 拮抗剂失败,并且其中25%未经TNF α 处理。使治疗组之间的人口资料和伴随IBD药物平衡。也使治疗组之间的基线疾病特征平衡,基线疾病活动性除外。

[0497] 对研究指定的主要终点是抗TNF- α 拮抗剂失败群体的第6周缓解(%)。评估(依序测试程序)的关键次要终点是:总群体的第6周缓解(%)、抗TNF- α 拮抗剂失败群体和总群体的第10周缓解(%) (使用Hochberg程序)、抗TNF- α 拮抗剂失败群体和总群体的第6周和第10周持续缓解(%) (使用Hochberg程序)、以及抗TNF- α 拮抗剂失败群体的第6周增强反应(%)。

[0498] 表52:基线CDAI:

[0499]

	安慰剂	维多珠单抗	p值
TNF ITT: 平均(标准差)	306.1 (55.43)	316.1 (52.63)	0.0945
总ITT: 平均(标准差)	301.3 (54.97)	313.9 (53.17)	0.0153

[0500] 表53:诱导研究结果:主要和关键次要终点

终点	TNF ITT (N=315)				总ITT (N=416)			
	PLA N=157	VDZ N=158	差异 (RR)	P值	PLA N=207	VDZ N=209	差异 (RR)	P值
主要第6周缓解	12.1 %	15.2 %	3.0 % (1.2)	0.433 2				
第1次要第6周缓解					12.1 %	19.1 %	6.9 % (1.6)	0.047 8
第2次要第10周缓解	12.1 %	26.6 %	14.4 % (2.2)	0.001 2	13 %	28.7 %	15.5 % (2.2)	<0.00 01
持续缓解(第6周与第10周两者)	8.3 %	12.0 %	3.7 % (1.4)	0.275 5	8.2 %	15.3 %	7% (1.9)	0.024 9
增强反应(CDAI100)	22.3 %	39.2 %	16.9% (1.8)	0.001 1				

[0502] 表54: 未经抗TNF- α 拮抗剂处理的患者的结果(n=101, 总体的24%)

[0503]

	安慰剂%	维多珠单抗%	差异%	95%CI
第6周缓解	12	31.4	19.1	(3.3, 35.0)
第10周缓解	16	35.3	19.2	(2.4, 35.8)

[0504] 表55: 研究结果: ITT总体的关键子组-先前Tx失败第6周和第10周时的临床缓解

子组	变量	安慰剂	VDZ	差异	95% CI
任何先前抗TNF失败(ITT的75%)	N	156	155		
	第6周缓解(%)	12.8	14.8	2	(-5.7, 9.7)
	第10周缓解(%)	12.8	26.5	13.6	(4.9, 22.3)
先前免疫调节剂失败而非抗TNF失败(21% ITT)	N	45	44		
	第6周缓解(%)	11.1	31.8	20.7	(-0.5, 39.7)
	第10周缓解(%)	15.6	31.8	16.3	(-1.1, 33.6)
仅先前皮质类固醇失败(3% ITT)	N	5	9		
	第6周缓解(%)	0	33.3	33.3	(-23.9, 75.7)
	第10周缓解(%)	0	44.4	44.4	(-13.4, 85.3)

[0506] 研究显示TNF- α 拮抗剂失败患者需要3个剂量来诱导缓解。TNF- α 拮抗剂失败患者的缓解率在第6周与第10周之间增加, 但仅针对维多珠单抗组(而非安慰剂)。未经TNF- α 拮抗剂处理的患者的缓解率在第6周与第10周之间实质上不增加。在具有高度疾病严重性的TNF- α 拮抗剂失败群体中, 43%从未对TNF- α 拮抗剂起反应, 并且45%丧失反应。

[0507] 实施例20:稳定性

[0508] 测试各种不同抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂在5℃下6至24个月过程内的稳定性(表6和7)。pH是6.0-6.2的制剂在6个月之后及在24个月时显示主要物质降解约小于4%。

[0509] 通过SEC持续多达24个月测试各种不同抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体制剂的稳定性(表4和5)。蛋白质浓度为60mg/mL且含有25mM柠檬酸盐的制剂在2年之后的聚集体变化是0.1%-0.2%，而含有160mg/mL蛋白质和25mM柠檬酸盐的制剂在2年内的聚集体增加是约0.3%。含有60mg/mL、110mg/mL或160mg/mL蛋白质、无柠檬酸盐的制剂有0.6%-1.1%的聚集体增加。对于含有柠檬酸盐、但无组氨酸的测试制剂，在12个月和24个月之后，有约0.3%-0.4%的聚集体生长。

[0510] 实施例21:测定维多珠单抗对CD4:CD8比平的影响

[0511] 以从10%蔗糖的冻干制剂复原且稀释至0.9%生理食盐水的输注系统中的单次450mg剂量的维多珠单抗治疗18-45岁健康受试者。在单次450mg剂量的维多珠单抗之前(基线)和之后5周,通过腰椎穿刺收集脑脊髓液(CSF)。各受试者充当其自身对照。

[0512] 基于先前研究选择5周时间点,所述研究显示以那他珠单抗治疗的MS患者仅在一个剂量之后即显示对CSF CD4+:CD8+淋巴细胞比率具有影响且减少脑病变的数目(Stuve等,Arch Neurol.2006;63:1383-1387;Stuve等,Ann Neurol.2006;59:743-747;Miller等,N Engl J Med.2003;348(1):15-23);且也因为在5周时,450mg剂量的维多珠单抗足以使目标饱和且提供超过与每4周300mg的第3期给药方案相关的估计稳态谷底含量的血清浓度。

[0513] 从各受试者获得约15mL CSF用于免疫表型分析。如果CSF样本满足以下准则,则将其纳入分析:每样本 ≤ 10 RBC/ μ L(以将外周血液污染减至最少);阴性CSF培养结果;在各流动式细胞测量术样本中有足够T淋巴细胞数目;以及未检测到针对维多珠单抗的血清抗体。

[0514] 第5周中值(34.80 μ g/mL)和个别受试者血清维多珠单抗浓度(范围24.9-47.9 μ g/mL)高于第3期给药方案的计划稳态谷底浓度(约24 μ g/mL)。如通过MAdCAM-1-Fc所测量,在第5周时观察到高度(>90%) $\alpha 4\beta 7$ 受体饱和,从而指示维多珠单抗在终点评估时使其目标饱和。

[0515] 在任何CSF样本中都未检测到维多珠单抗(检测限值=0.125 μ g/mL)。

[0516] 对CD4+和CD8+T淋巴细胞数目和比率的影响

[0517] 维多珠单抗不显著减小CD4+:CD8+比率(表56)。受试者中没有有一个在给药后CD4+:CD8+比率 < 1 ($p < 0.0001$ (1侧t检验))。维多珠单抗不显著减小CSF中的CD4+或CD8+T淋巴细胞的数目。此外,CSF CD4+T淋巴细胞%和CD8+T淋巴细胞%无显著变化(表57)。此外,未观察到外周血液WBC、CD4+和CD8+记忆T淋巴细胞有显著变化(表58)。

[0518] 表56:治疗对CSF CD4+:CD8+比率的影响(可评估群体,n=13)

	基线	第5周	CD4+:CD8+比率差异†
[0519] CD4+:CD8+比率	3.59 (0.273)	3.60 (0.265)*	0.01 (0.197)
平均(SE)范围	1.53-5.67	1.42-5.15	
比率的90% 2侧CI	3.00-4.19	3.132, 4.077	
差异的90% 2侧CI			-0.337, 0.363

[0520] CI=置信区间

[0521] * $p < 0.0001$ ($H_0: \mu < 1$ 对 $H_1: \mu \geq 1$ 的一侧一个样本t检验)。

[0522] +差异定义为第5周比率减去基线比率

[0523] 表57:治疗对CSF CD4+和CD8+淋巴细胞计数的影响(可评估群体,n=13)

[0524]		基线	第5周
	淋巴细胞%形式的CD4+, 平均值(SD)	75.160 (7.3831)	74.215 (6.3732)
	淋巴细胞%形式的CD8+, 平均值(SD)	22.272 (5.4320)	22.007 (6.1624)

[0525] 表58:外周血液记忆T淋巴细胞(R0+)计数(可评估群体,n=13)

[0526]

	基线	第5周
	平均值(SD)	平均值(SD)
CD4+CD45RO+	27.85 (4.98)	27.06 (5.02)
CD8+CD45RO+ (%)	11.24 (3.40)	10.78 (2.98)

[0527] 概述

[0528] 在单次450mg剂量之后,维多珠单抗不影响健康志愿者的CSF CD4+和CD8+细胞计数或CD4+:CD8+比率。受试者中没有一个在给药后CSF CD4+:CD8+比率减小至小于1。在CSF中未检测到维多珠单抗。此外,未观察到外周血液中总WBC或记忆T淋巴细胞CD4+和CD8+子组有变化。在终点评估时,在所有受试者中都出现血液中目标(α 4B7)饱和。CSF CD4+和CD8+淋巴细胞含量和比率类似于文献中先前报道的含量和比率。

[0529] 这些结果与维多珠单抗对猴的生理性CNS免疫监视与病理性CNS发炎两者缺乏影响一致。

[0530] 虽然本发明已参考其优选实施方案进行特定显示和描述,但本领域技术人员应了解,可在不脱离由随附权利要求涵盖的本发明的范围下在其中在形式和细节方面做出各种改变。

[0531] 表59:序列

[0532]

SEQ NO:	ID	所示序列	描述
1	图1		编码人源化抗 $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白的重链的DNA
2	图1		人源化抗 $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白的重链的氨基酸序列
3	图2		编码人源化抗 $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白的轻链的DNA
4	图2		人源化抗 $\alpha 4\beta 7$ 免疫球蛋白的轻链的氨基酸序列
5	图3		LDP-02的成熟人源化轻链
6	图4		同属人 κ 轻链恒定区
7	图4		同属鼠类 κ 轻链恒定区
8	参考第31页 SYWMH		重链小鼠ACT-1抗体的CDR1
9	参考第31页 EIDPSESNTNYNQKFKG		重链小鼠ACT-1抗体的CDR2
10	参考第31页 GGYDGWDYAIDY		重链小鼠ACT-1抗体的CDR3
11	参考第31页 RSSQSLAKSYGNTYLS		轻链小鼠ACT-1抗体的CDR1
12	参考第31页 GISNRFS		轻链小鼠ACT-1抗体的CDR2
13	参考第31页 LOGTHQPYT		轻链小鼠ACT-1抗体的CDR3
14	图7		人GM607 CL抗体 κ 轻链可变区
15	图7		人21/28 CL抗体重链可变区

[0533]

序列表

<110> 米伦纽姆医药公司

<120> 抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体的制剂

<130> 079259-0603

<140>

<141>

<150> US 61/544,054

<151> 2011-10-06

<150> US 61/481,522

<151> 2011-05-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

[0001]

<210> 1

<211> 1445

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明:合成的多核苷酸

<400> 1

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat cctcctcttc ttggtagcaa	60
cagctacagg tgtccactcc cagggtcaat tgggtcagtc tggggctgag gtaagaagc	120
ctggggcttc agtgaagggt tcttgcgaagg gttctggeta caccctcacc agctactgga	180
tgcattgggt gaggcaggcg cctggccaac gtctagagtg gatcggagag attgatcctt	240
ctgagagtaa tactaactac aatcaaaaat tcaagggacg cgtcacattg actgtagaca	300
tttccgctag cacagcctac atggagctct ccagcctgag atctgaggac actgcggtct	360
actattgtgc aagaggggggt tacgacggat gggactatgc tattgactac tggggtcga	420

	geacctggt caccgtcage tcagcteca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac	480
	cctcctccaa gageacctct gggggcacag cggccctggg ctgectggtc aaggactact	540
	tcccgaacc ggtgacggtg tegtggaaet caggcgcctt gaccageggc gtgcacacct	600
	tcccggtgt cctacagtc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgcctt	660
	ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca	720
	aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc	780
	cagcactga actcggggg gcaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca	840
	ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag	900
	acctgaggt caagttcaac tggtagtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa	960
	agccgcgga ggagcagtc aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtctgc	1020
	accaggactg gtgaatggc aaggagtaca agtgaaggt ctccaacaaa gccteccag	1080
[0002]	ccccatga gaaaaccate tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca	1140
	cctgcccc atccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca	1200
	aaggttcta tcccagcag atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca	1260
	actacaagac caagcctccc gtgtggact ccgacggctc cttcttcttc tacagcaage	1320
	tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcctgcttc gtgatgcatg	1380
	aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt aaataatcta	1440
	gagca	1445
	<210> 2	
	<211> 470	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<221> 来源

<223> 人工序列说明:合成的多肽

<400> 2

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

[0003]

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ala Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

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

	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro	
	165	170 175
	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr	
	180	185 190
	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val	
	195	200 205
	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn	
	210	215 220
	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro	
	225	230 235 240
[0004]	Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu	
	245	250 255
	Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp	
	260	265 270
	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	
	275	280 285
	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	
	290	295 300
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	
	305	310 315 320
	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp	
	325	330 335

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

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

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

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

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

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

[0005]

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 3

<211> 751

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明:合成的多核苷酸

<400> 3		
gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catectcttc tiggtagcaa	60	
cagctacagg tgtccactcc gatgtagtga tgactcaaag tccactctcc ctgcctgtca	120	
cccctggaga accagcttct atctcttgca ggcttagtca gagtcttgca aagagttatg	180	
ggaaacaccta ttgtcttgg tacctgcaga agcctggcca gttccacag ctctcatct	240	
atgggatttc caacagattt tctgggggtgc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggga	300	
cagatttcac actcaagatc tcgcgagtag aggctgagga cgtgggagtg tattactgct	360	
tacaaggtac acatcagccg tacacgttcg gacaggggac caaggtggag atcaagegta	420	
eggtggetgc accatctgtc ttcattctcc cggcatctga tgagcagttg aaatctggaa	480	
ctgectctgt tgtgtgectg ctgaataact tctateccag agaggccaaa gtacagtgga	540	
aggtggataa cggcctccaa tcgggtaact ccagagagag tgtcacagag caggacagca	600	
[0006] aggcagcagc ctacagctc agcagcacc tgacctgag caaagcagac tacgagaaac	660	
acaaagtcta cgcctgcgaa gtcaccatc agggcctgag ctgcctcgtc acaaagagct	720	
tcaacagggg agagtgttag tctagagcag c	751	

<210> 4

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明:合成的多肽

<400> 4

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
1															

Val	His	Ser	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20	25	30
Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu		
35	40	45
Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro		
50	55	60
Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser		
65	70	75 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
	85	90 95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys		
100	105	110
[0007]		
Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val		
115	120	125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro		
130	135	140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu		
145	150	155 160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn		
	165	170 175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser		
180	185	190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala		

195

200

205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 5

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列说明:合成的多肽

<400> 5

[0008]

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

[0009] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20

25

30

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

[0010]

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 7

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 35 40 45

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

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 8

Ser Tyr Trp Met His

1 5

[0011]

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 9

Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 10

Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 11

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 12

Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

[0012]

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus sp.)

<400> 13

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr
1 5

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

	20	25	30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro			
	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
	65	70	75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala			
	85	90	95
Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110
[0013]			
<210> 15			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 15			
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 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
20 25 30			
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met			
35 40 45			
Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe			
50 55 60			

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg 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

[0014]

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

新LDP02重链DNA--含有克隆位点(小写), Kozak序列(大写)和前导序列(小写)

```
gaattcggatgatCTACcCatggatggagctgtatcctctcttcttggtagcaacagclacaggtgtccactcccag
gtgCAATTGGTGcAGTCTGGGCTGAGGTTAAGAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCCTGCAAGGGTTCCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCCATTGGG
TGAGGCAGGCGCTGGCCAAcCGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
TGAGAGTAATACTAACTACAATCAAAATTCaAGGACGGCTCACATTGACT
GTAGACATTTCcCGTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGTTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGTCAAGGCACCTGTGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCA
CCAAGGGCCCAcCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCaAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCCGGC
TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCAcCCAGACCTACAATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTTGTGACAAAACTCAC
ACATGCCCCACCGTGCCcAGCACCTGAACCTCGGGGGGCAcCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCCaAGGACACCCCTCATGATCTCCCCGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCaAGACAAAGCCCGGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTcAGCGTCTCACCCTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGC
```

图1A

AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCT
 GCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTACGCTGACCTGCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
 AGCGGAGAACTACAAGACACGCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTC
 CTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAtaatagagca

新LDP02重链蛋白质(VHL、VH与人IgG1-FcRmut之间的间隙)

MGWSCHILFLVATATGVHS

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKGSGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIDP
SESNTNYNQKFKGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGGWDY
AIDYWGQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHHTCP
 PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPPVLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

图1B

新LDP02重链DNA--含有克隆位点(小写), Kozak序列(大写)和前导序列(小写)

```
gaattcgcgagatcgatCTACCCatgggatggagctgtagctatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccacctcgat
GTAGTGATGACTCAAGTCCACTCTCCCTGCCCTGTCAACCCCTGGAGAACCCAGC
TTCTATCTCTTGCAAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAGAGTTATGGGAACACCT
ATTGTCTTGGTACCTGCAGAAAGCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT
GGGATTTCCACAGATTTTCTGGGTGCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGTT
CAGGGACAGATTTACACTCAAGATCTCGCGAGTAGAGGCTGAGGACGTGGG
AGTGTAATTACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTCCGACAGGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACCGTGGTGCCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCCTCTGTTGTGCTGCTGA
ATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGAATAACGCCCT
CCATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagtctagagcgc
```

新LDP02轻链蛋白质(VKL、VK与人Cκ之间的间隙)

```
DVVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNITYLSWYLQKPGQSPQLLIYGI
SNRFSGVKVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQLGTHQPYTFGGQGTKVEI
RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYVEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

图2

成对新MLN02-无信号		LDP-02-无信号.txt	
A	1	DVVMTQSP LSLPVTGPGEPAISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ	50
B	1	DVVMTQSP LSLPVTGPGEPAISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ	50
	51	LLIYGISNRFSGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDVGVYYCLQGT HQP	100
	51	LLIYGISNRFSGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDVGVYYCLQGT HQP	100
	101	YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK	150
	101	YTFGQGTKVEIKRADAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK	150
	151	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACE	200
	151	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACE	200
	201	VTHQGLSSPVTKSENRGEC	219
	201	VTHQGLSSPVTKSENRGEC	219

图3

成对人K恒定区		MI:鼠类K恒定区.txt
A 1	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvc1lnnfypreakvqwkvdnalqsg	50
	. : : . : . .	
B 1	radaaptvsiifppsseqltsggasvvcflnnfypkdinvkwidgserqn	50
	. : : . : . .	
51	nsqesvteqdkdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtk	100
	: : . : . : . .	
51	gvlnswtdqdkdstysmsstlttkdeyerhnsytceathktstspivk	100
101	sfnrgec	107
101	sfnrnec	107

图4

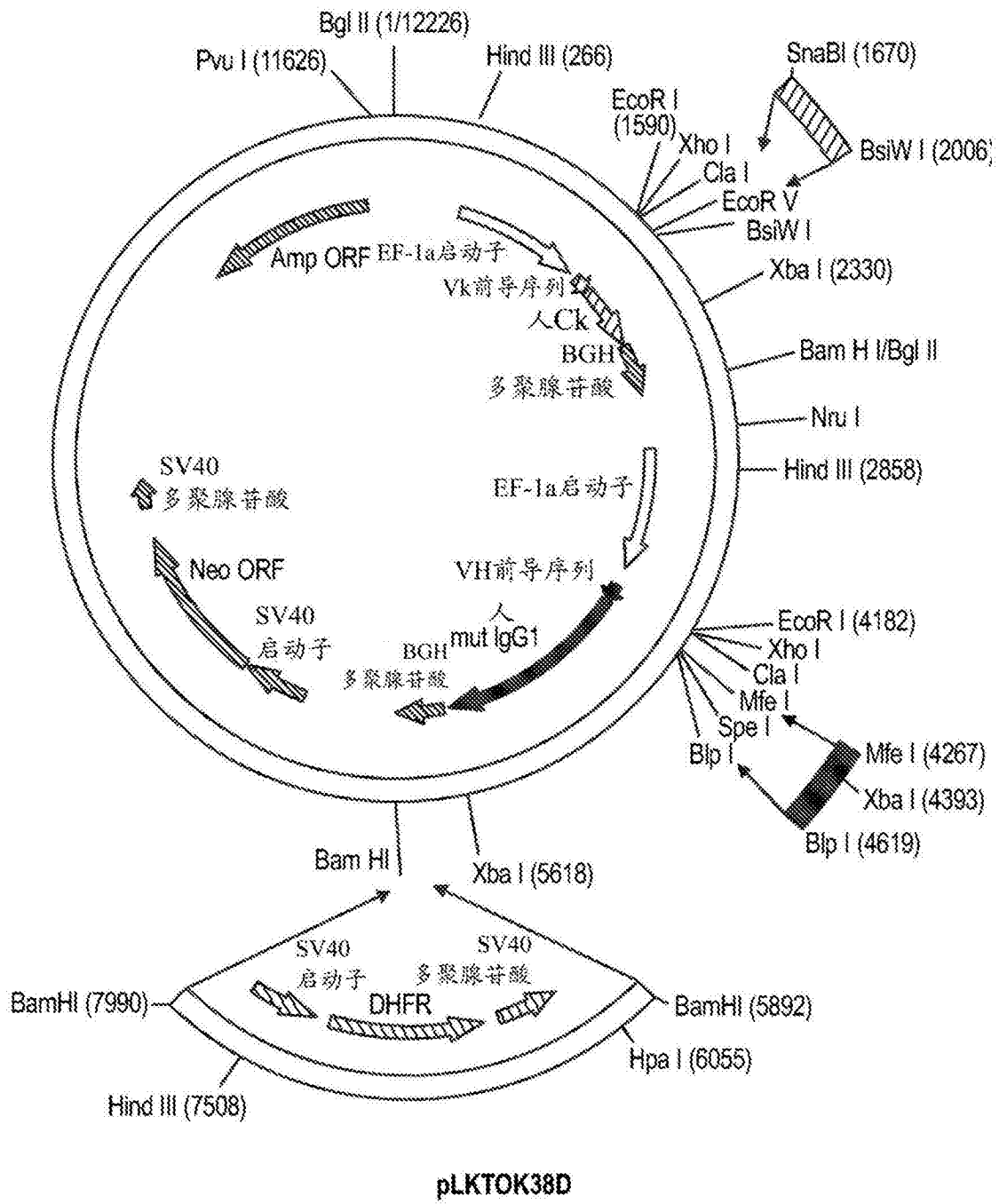


图5

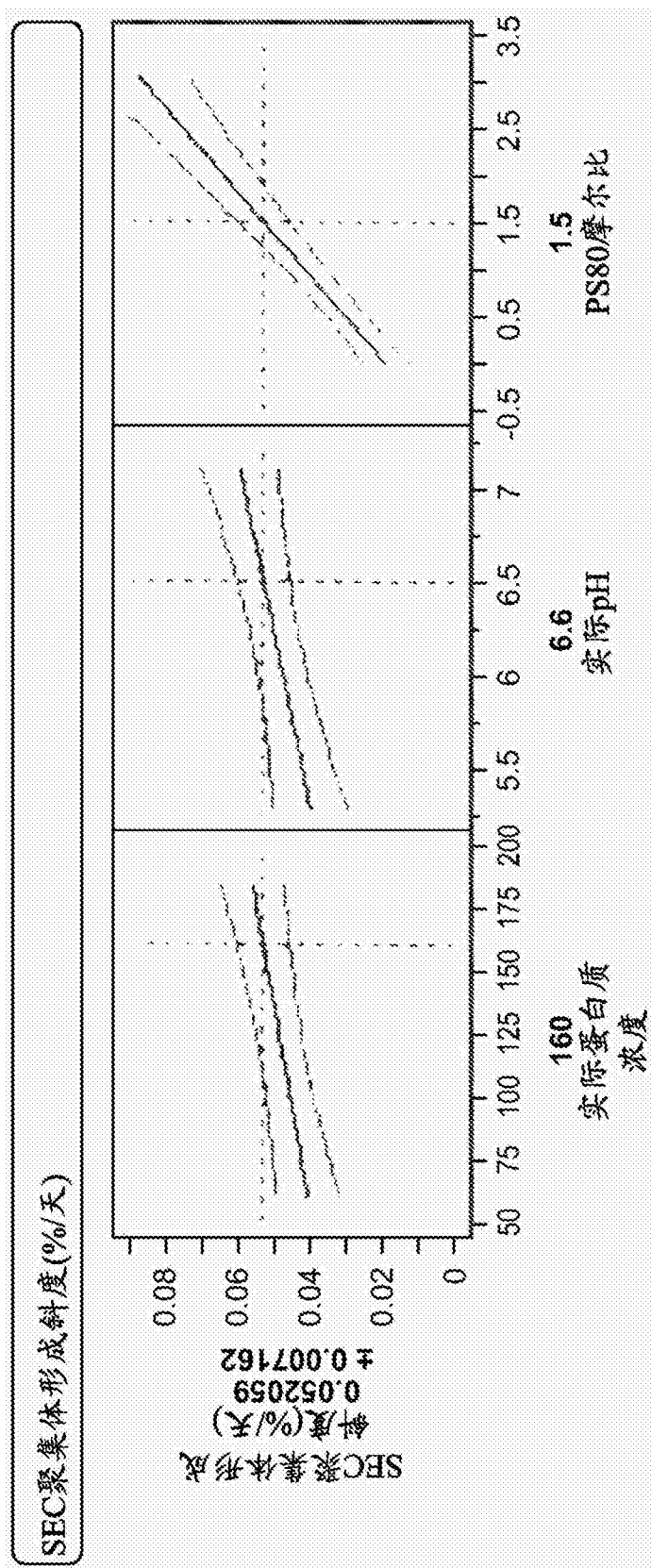


图6

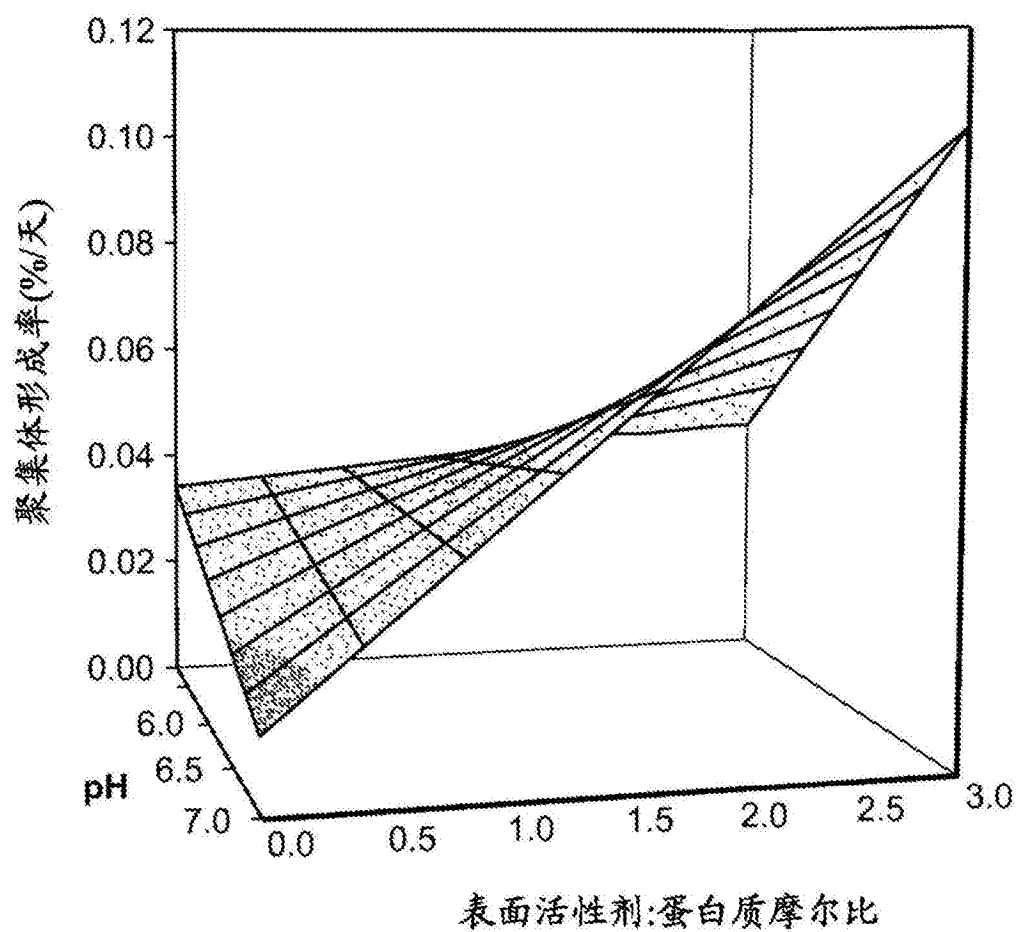


图7

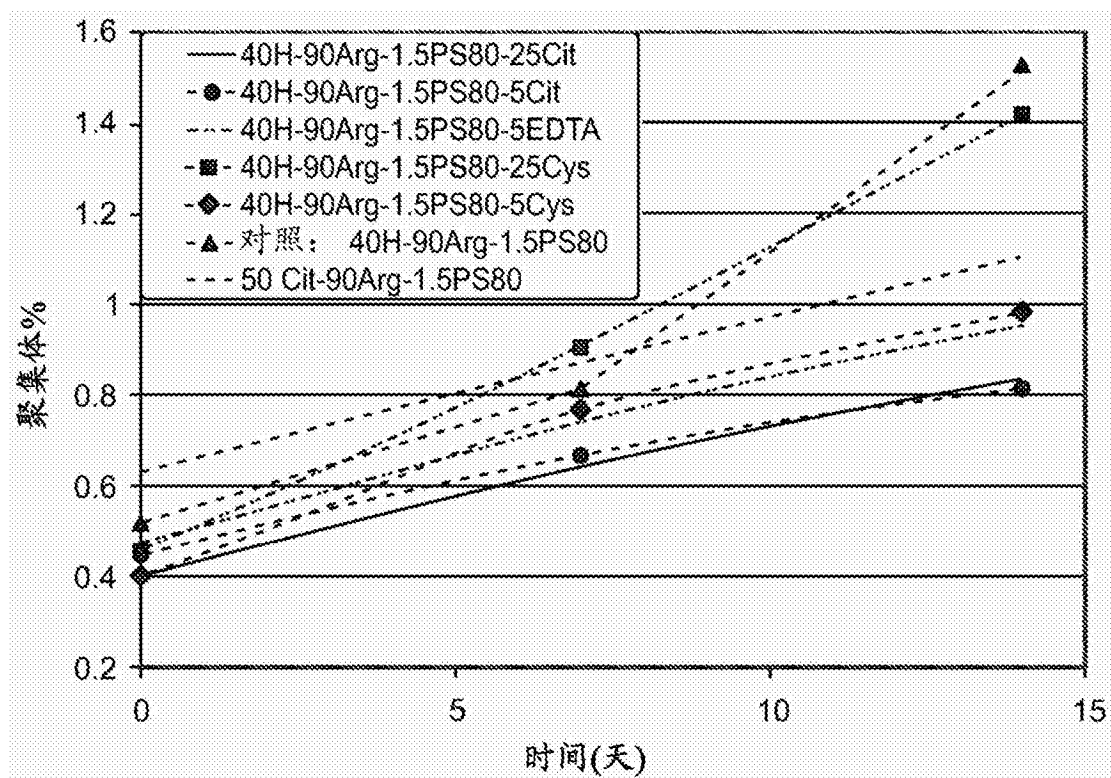


图8

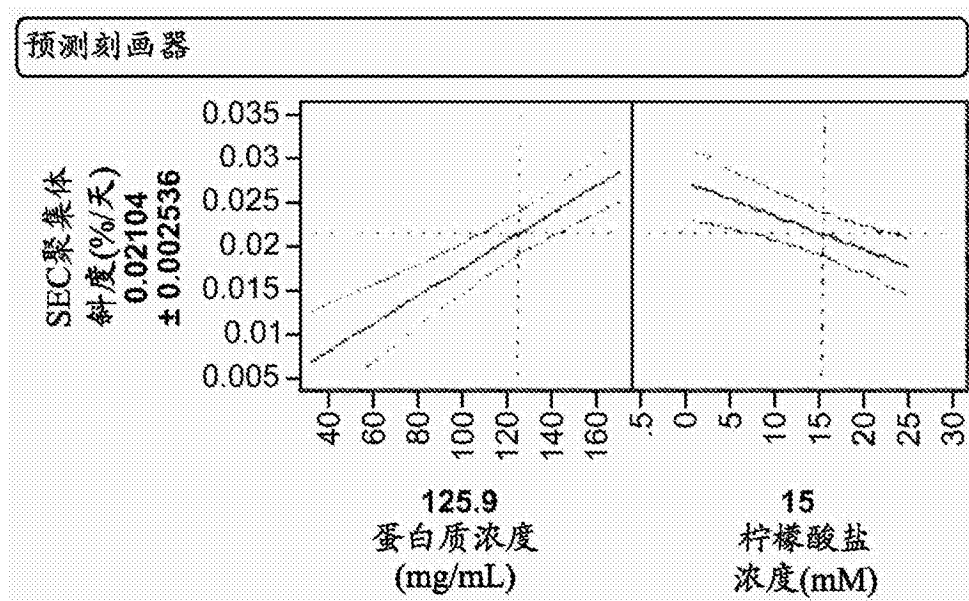


图9

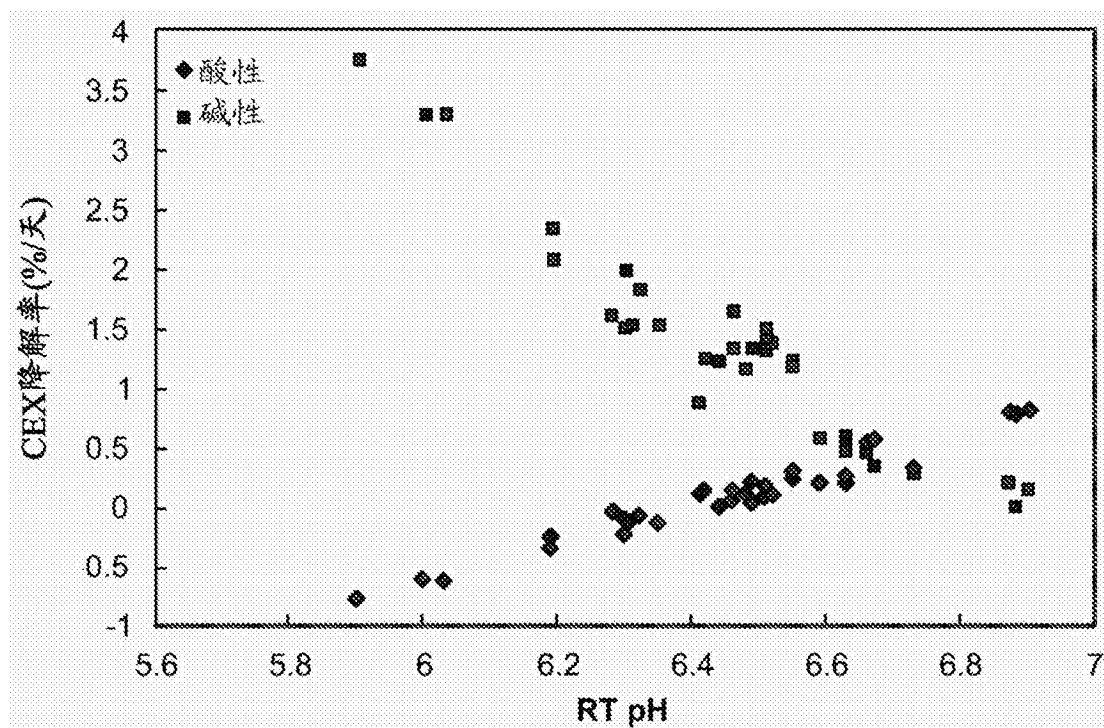


图10

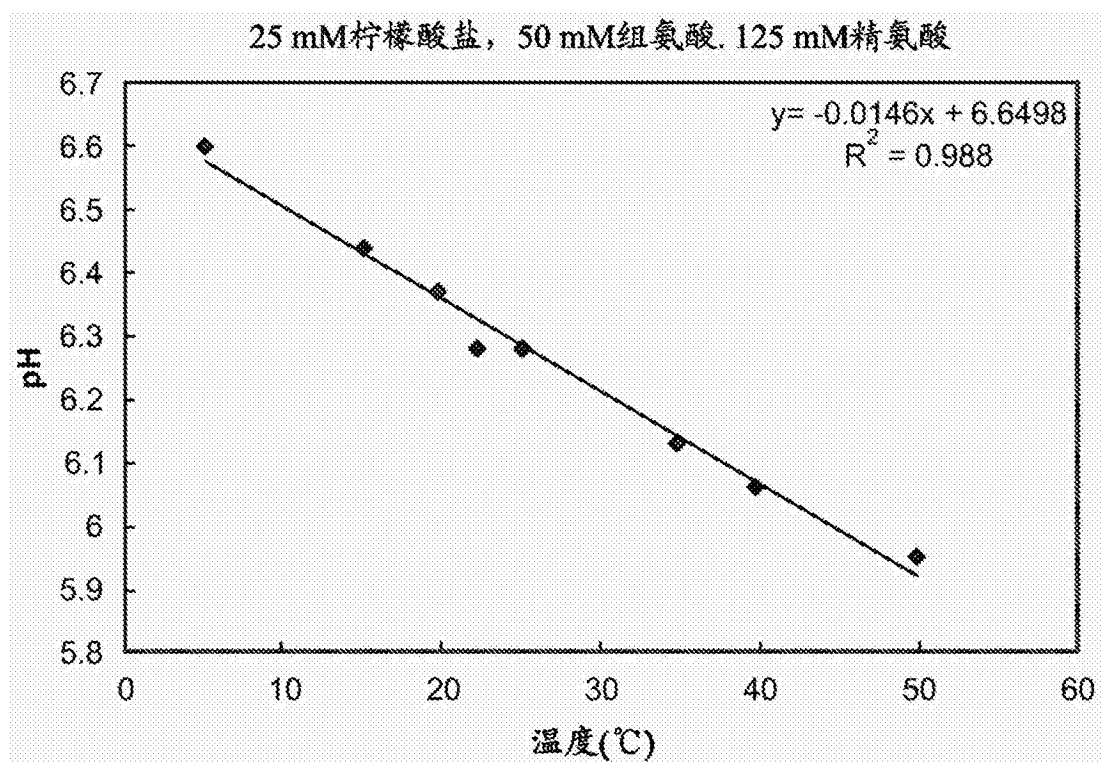


图11

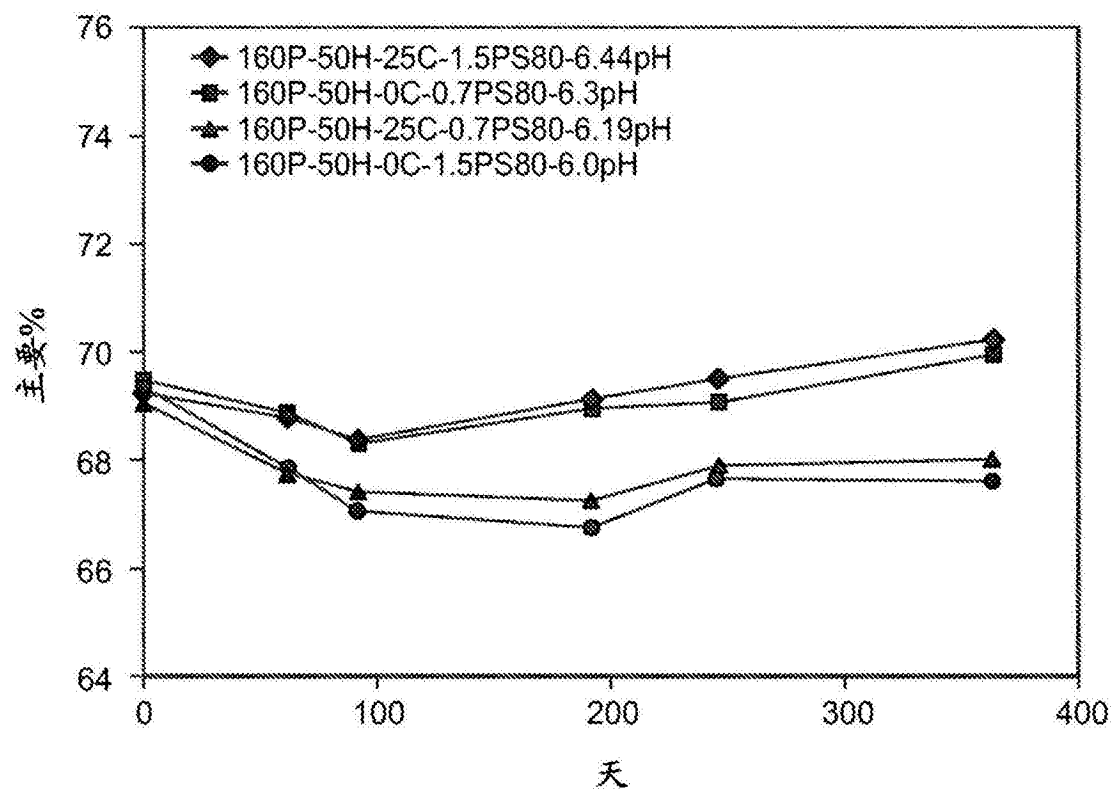


图12

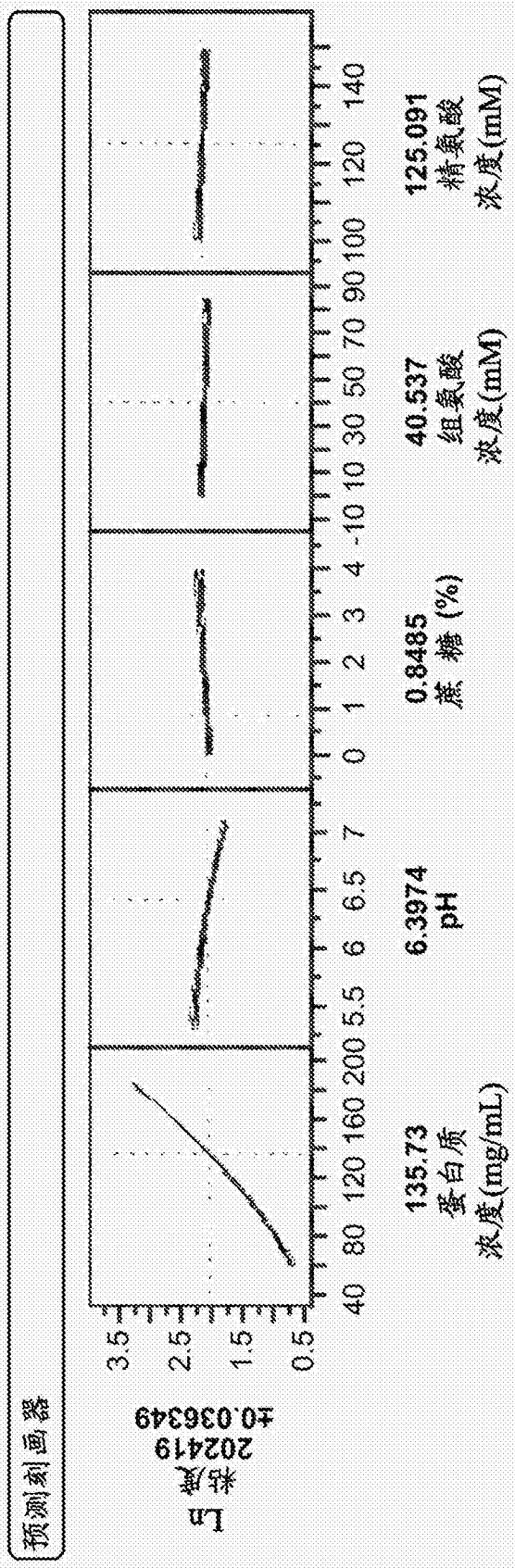


图13

GM607'C1抗体κ轻链
可变区

SEQ ID NO: 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

图14A

21/28'CL抗体重链
可变区

SEQ ID NO: 15

```

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 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20           25           30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
          35           40           45
Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
          50           55           60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg 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 Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

图14B

预填充注射器中的蛋白质产物的组分

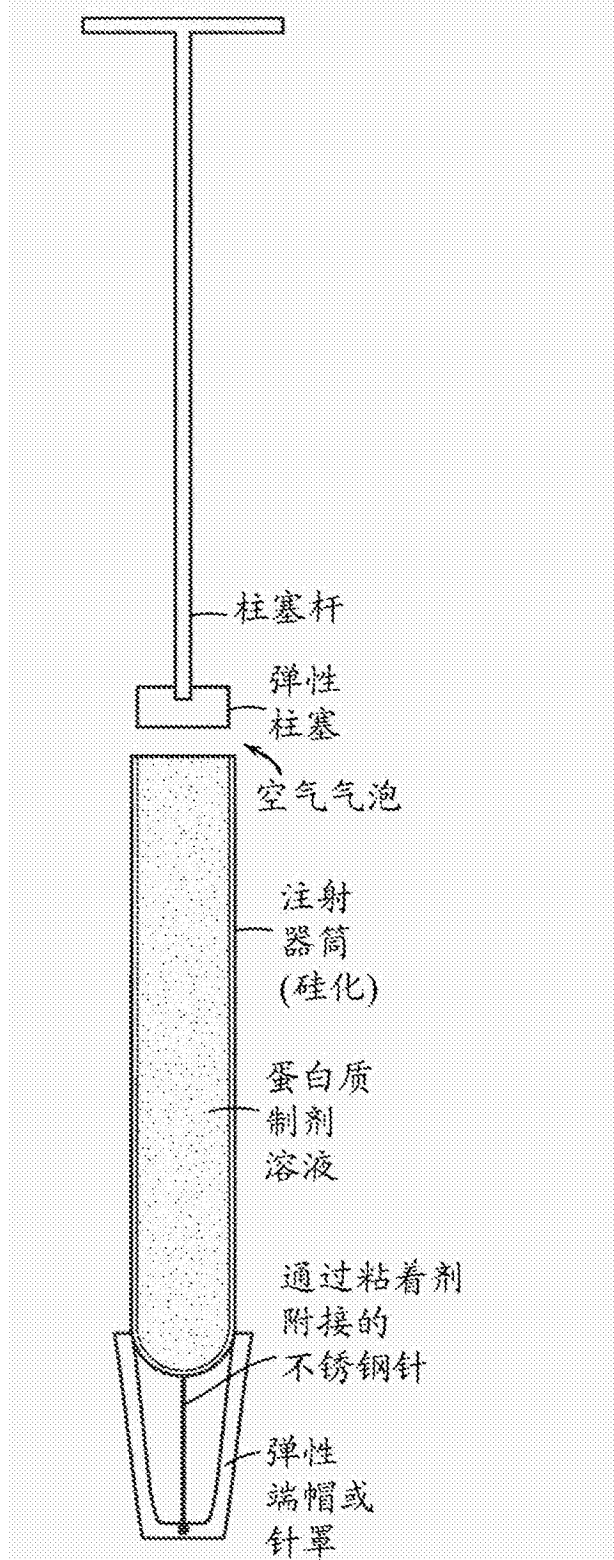


图15

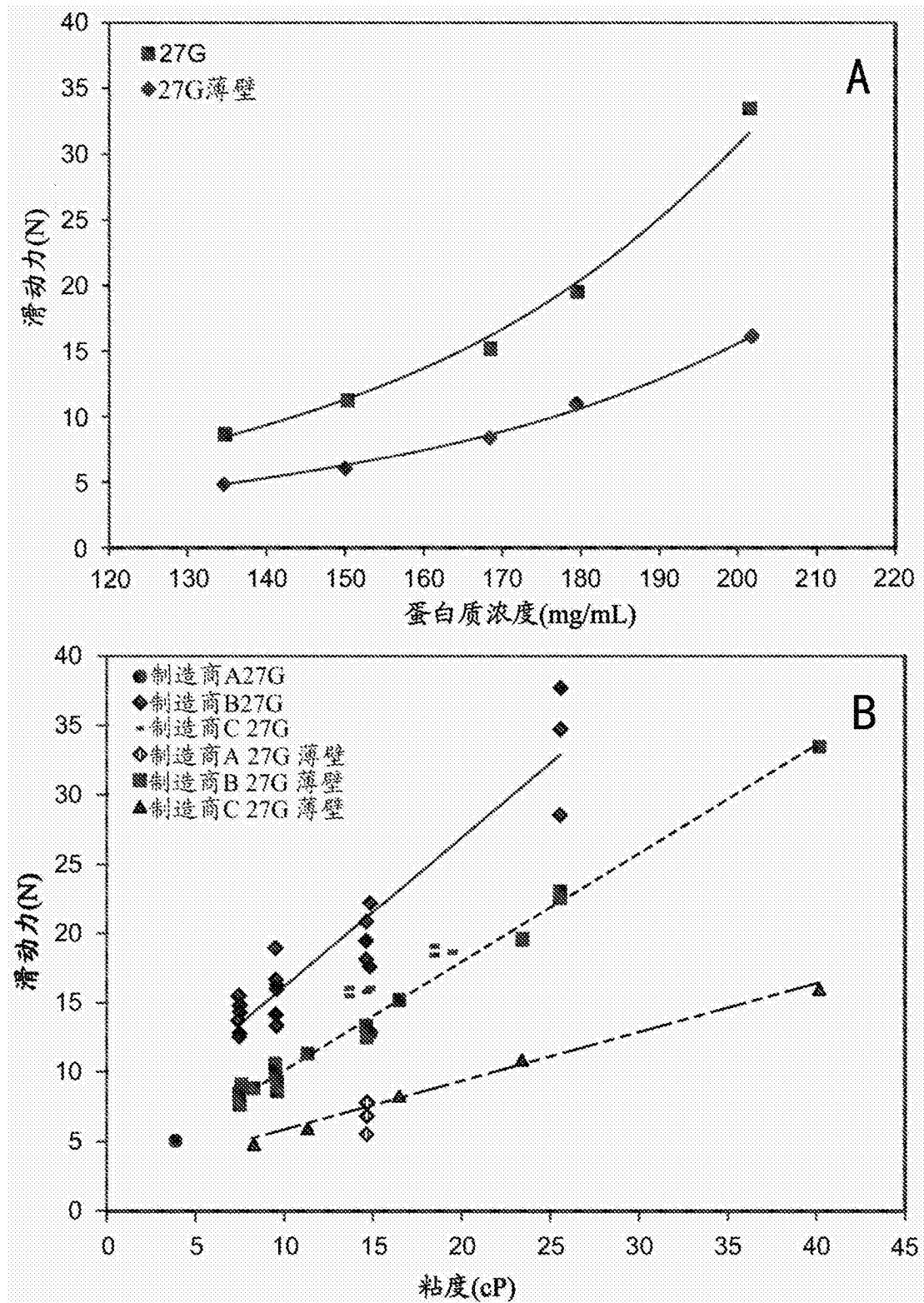


图16

预测刻画器：初始滑动力

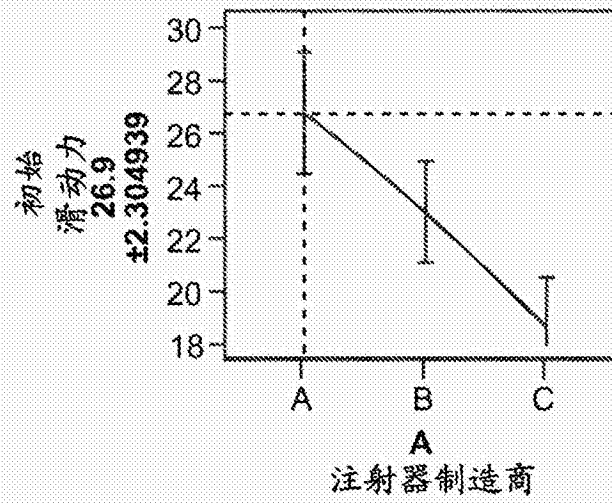


图17A

预测刻画器：初始滑动力

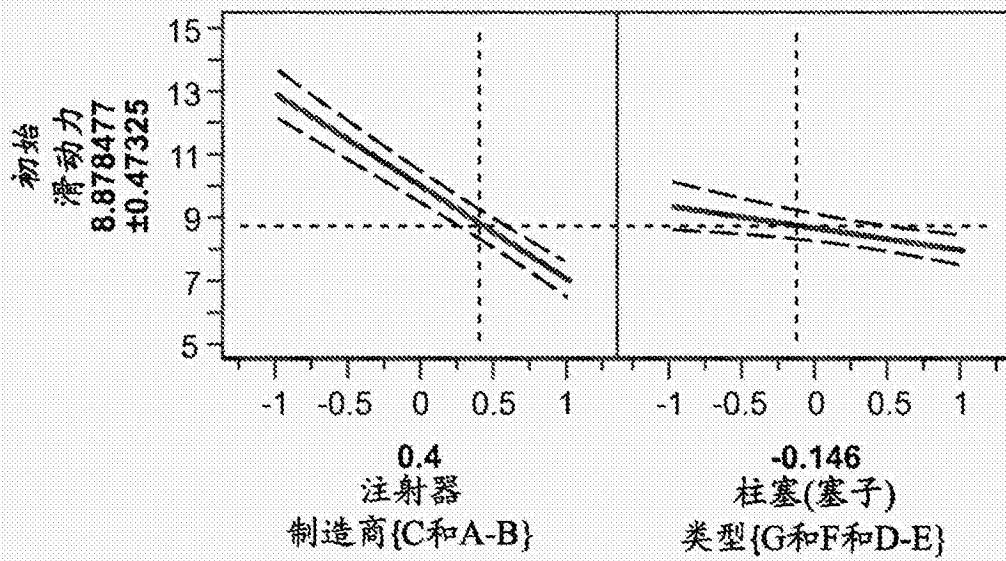


图17B

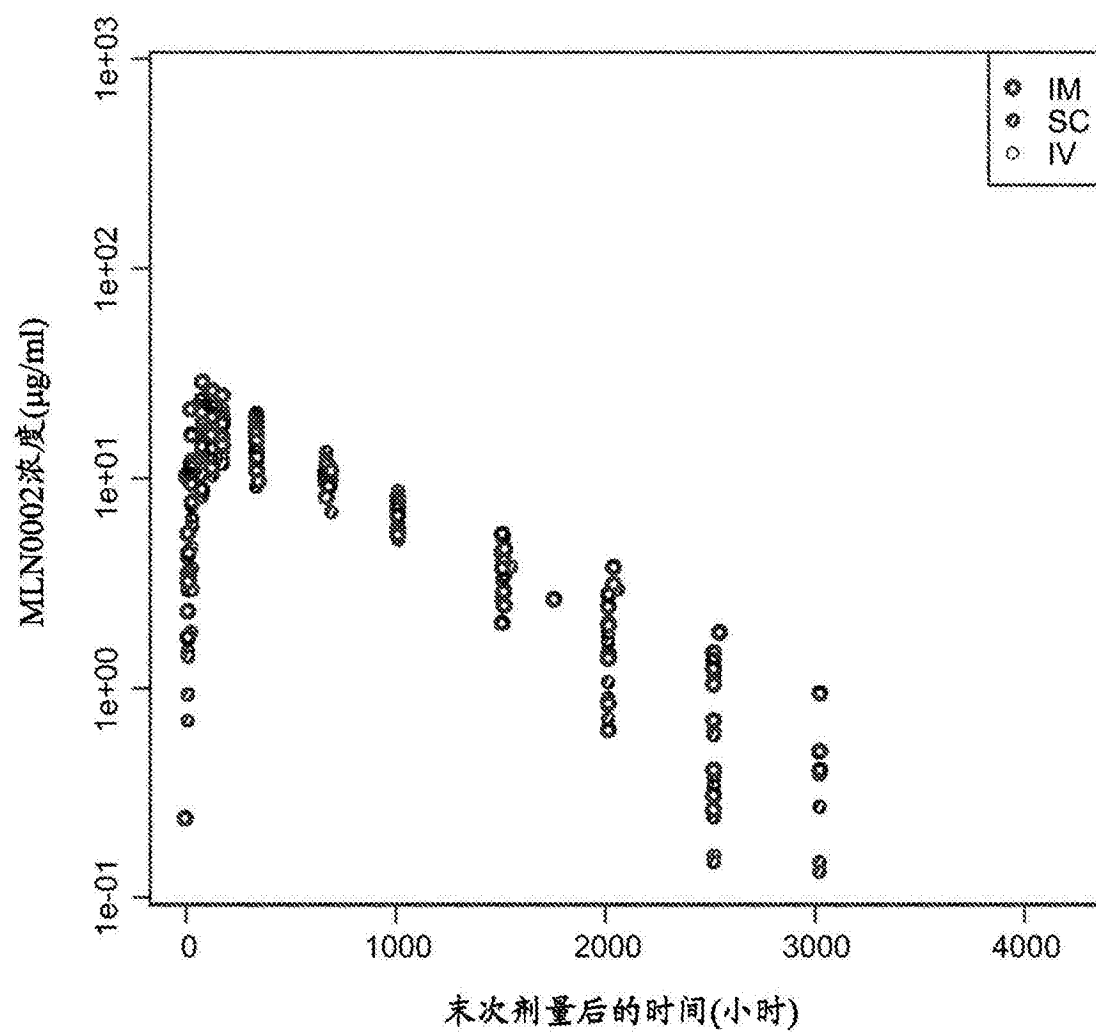


图18