

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024年7月4日 (04.07.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/140939 A2

(51) 国际专利分类号:

A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物医药纳米园B6-501, Jiangsu 215123 (CN)。孙迪(SUN, Di); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物医药纳米园B6-501, Jiangsu 215123 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/142858

(22) 国际申请日: 2023年12月28日 (28.12.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211710550.3 2022年12月29日 (29.12.2022) CN

(71) 申请人: 苏州创胜医药集团有限公司 (SUZHOU TRANSCENTA THERAPEUTICS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物医药纳米园B6-501, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所 (ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(72) 发明人: 张凡 (ZHANG, Fan); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物医药纳米园B6-501, Jiangsu 215123 (CN)。胡裕迪 (HU, Yudi); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物医药纳米园B6-501, Jiangsu 215123 (CN)。邵琦 (SHAO, Qi); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物医药纳米园B6-501, Jiangsu 215123 (CN)。钱雪明 (QIAN, Xueming); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物医药纳米园B6-501, Jiangsu 215123 (CN)。李红俊 (LI, Hongjun); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物医药纳米园B6-501, Jiangsu 215123 (CN)。顾怡 (GU, Yi); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物医药纳米园B6-501, Jiangsu 215123 (CN)。滕菲 (TENG, Fei); 中国江苏

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 不包括国际检索报告, 在收到该报告后将重新公布(细则48.2(g))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: PHARMACEUTICAL PREPARATION COMPRISING THERAPEUTIC ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 含有治疗性抗体的药物制剂及其用途

(57) Abstract: Provided in the present invention are a stable pharmaceutical preparation containing a monoclonal antibody that is present in high and low concentrations and that specifically binds to human MASP-2, a kit, a pharmaceutical composition and a unit dosage form containing the preparation, and a treatment method for inhibiting MASP-2 dependent complement activation and treating related diseases by means of using the preparation, the kit, the pharmaceutical composition and the unit dosage form, and the use in the preparation of a corresponding agent. Further provided in the present invention is a new monoclonal antibody that specifically binds to human MASP-2.

(57) 摘要: 本发明提供了包含以高浓度和低浓度存在的特异性结合至人MASP-2的单克隆抗体的稳定的药物制剂, 以及包含所述制剂的试剂盒、药物组合物、单位剂型, 和使用所述制剂和试剂盒、药物组合物、单位剂型用于抑制MASP-2依赖性补体活化、治疗相关疾病的治疗方法, 以及制备相应药剂的用途。本发明还提供了新的特异性结合至人MASP-2的单克隆抗体。



WO 2024/140939 A2

含有治疗性抗体的药物制剂及其用途

技术领域

本发明属于药物制剂领域，具体涉及治疗性抗体制剂的领域。更具体来说，本发明涉及包含特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体的药物制剂，及其用途。

背景技术

MASP-2 (MBL 相关的丝氨酸蛋白酶 2) 参与补体系统，它与 MASP-1 和两个 C1q 相关的丝氨酸蛋白酶 C1r 和 C1s 显示出显著的同源性。一旦凝集素识别并与病原体结合，MASP-2 的酶原形式就会在 CCP2 和 SP 结构域之间裂解 (在保守的 R444 和 I445 之间裂解)，变成由两条多肽链 (重链/A 链和轻链/B 链) 组成的活性形式，通过二硫键 (C434-C552) 连接 (A.B.W.Boldt et al., Human Immunology, 72(9): 753-760 (2011))。当 MBL 与病原体结合时，MASP-2 被激活，将补体成分 C4 和 C2 裂解为 C4a、C4b、C2a 和 C2b，生成 C3 转化酶 C4bC2b，随后 C3 被 C4bC2b 转化为 C3b，最后在 C5 被 C3b 转化为 C5b 后形成膜攻击复合物 (MAC)。C3 的激活最终导致 MAC 的形成，然后启动下游补体系统的一系列级联激活过程，刺激先天免疫反应。事实上 C4b 可以激活 C4d 的生成。C4d 的沉积可能是补体激活的一个标志。有研究表明，C4d 阳性染色是 IgAN 患者发生 ESRD 的独立风险因素 (见, Clin J Am Soc Nephrol 9: 897-904, 2014)，在 IgAN 患者中，有 C4d 染色的肾脏比没有 C4d 染色的肾脏生存时间明显短。在狼疮性肾炎和膜性肾小球肾炎患者的肾脏中也检测到 C4d 染色。MASP-2 已被确定为治疗自身免疫性疾病的一个非常有希望的靶点。

除了在免疫防御中的重要作用外，补体系统在许多临床情况下也会造成组织损伤。目前，仍然需要治疗上有效的补体抑制剂，如新的 MASP-2 抗体，特别是那些具有有利的高结合亲和力和特异性的抗体，以防止不良反应。

治疗性抗体需要配制为适用于向患者给药的制剂，并且所述制剂还能够维持其在储存和后续使用期间的稳定性。例如，如果所述制剂溶液配置不当，其中的治疗性抗体可能更容易发生降解、聚集和/或非所需甚至有害的化学修饰。液体制剂中的抗体的稳定性不仅视制剂中所使用的赋形剂的种类而定，并且还视赋形剂相对于彼此的量和比例而定。此外，当制备液体抗体制剂时，除稳定性之外，还必须考虑其它因素，例如给定制剂可容纳的抗体浓度和制剂的视觉质量或外观，等等。因此，当配制治疗性抗体制剂时，必须格外谨慎以获得保持稳定、含有足够浓度的抗体且具有使得制剂能够方便地施用至患者的其它特性的制剂。

对于抗 MASP-2 抗体，例如，Omeros 公司的单抗 Narsoplimab (OMS721) 进入了 III 期临床，其在中国专利申请号 CN201780051640.7 中公开了 MASP-2 抗体制剂，含 185mg/mL 的蛋白，20mM L-组氨酸，200mM L-精氨酸 HCl，0.01% (w/v) 的聚山梨酯 80，pH5.5-6.5。然而，上述制剂处方不能使本发明抗 MASP-2 单抗达到符合要求的稳定性，因此对于本发明提供的新型抗 MASP-2 单克隆抗体，仍有开发稳定的针对本发明抗 MASP-2 抗体的稳定的液体制剂需要。

发明简述

MASP-2 是重要和有利的治疗靶标。本发明提供了本发明抗 MASP-2 抗体制剂处方, 可以使本发明抗 MASP-2 单抗在较高浓度和低浓度情况下的液体状态时维持较好的稳定性, 满足生产工艺和临床给药的需求, 可以支持将本发明抗 MASP-2 单抗开发为静脉注射液和皮下注射液。本发明还提供了针对 MASP-2 的抗体。

一、本发明的抗体制剂

一方面, 本发明提供了一种稳定液体药物制剂, 其特征在于, 所述药物是特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段, 并且所述制剂还包含缓冲液、表面活性剂、和辅料。

在本发明的一些实施方案中, 所述稳定液体药物制剂中所述的缓冲液包含组氨酸和/或醋酸缓冲体系; 所述表面活性剂包含聚山梨酯; 所述辅料包含蔗糖、海藻糖和/或脯氨酸; 所述稳定液体药物制剂的 pH 值为 4.7-6.1。

因此, 在本发明的一些实施方案中, 提供了一种稳定液体药物制剂, 其包含: (a) 特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段; (b) 包含组氨酸和/或醋酸缓冲体系的缓冲液; (c) 包含聚山梨酯的表面活性剂; 和 (d) 包含蔗糖、海藻糖和/或脯氨酸的辅料; 其中所述制剂的 pH 为 4.7-6.1。

在一些实施方案中, 抗体浓度为 $10 \text{ mg/ml} \pm 1 \text{ mg/ml}$ 至 $200 \text{ mg/ml} \pm 20 \text{ mg/ml}$ 。在一些实施方案中, 抗体浓度为 $20 \text{ mg/ml} \pm 2 \text{ mg/ml}$ 。在一些实施方案中, 抗体浓度为 $60 \text{ mg/ml} \pm 6 \text{ mg/ml}$ 。在一些实施方案中, 抗体浓度为 $100 \text{ mg/ml} \pm 10 \text{ mg/ml}$ 。在一些实施方案中, 抗体浓度为 $150 \text{ mg/ml} \pm 15 \text{ mg/ml}$ 。在一些实施方案中, 抗体浓度为约 20 mg/ml 至约 100 mg/ml 。

在一些实施方案中, 所述缓冲液包含组氨酸, 并且其浓度为 $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 至 $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ 。在一些情况下, 组氨酸缓冲液浓度为 $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ 。在一些实施方案中, 组氨酸缓冲液包含 L-组氨酸和一水合 L-组氨酸盐酸盐。在一些情况下, 所述缓冲液包含 0.175 mg/ml 的 L-组氨酸和 1.86 mg/ml 的一水合 L-组氨酸盐酸盐。

在一些实施方案中, 所述缓冲液包含醋酸, 并且其浓度为 $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 至 $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ 。在一些情况下, 醋酸缓冲液浓度为 $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 。在一些实施方案中, 醋酸缓冲液包含醋酸和三水合醋酸钠。

在一些实施方案中, 聚山梨酯浓度为 $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ (w/v)。在一些情况下, 聚山梨酯浓度为 $0.05\% \pm 0.01\%$ (w/v)。在一些实施方案中, 聚山梨酯为聚山梨酯 20。在一些实施方案中, 聚山梨酯为聚山梨酯 80。

在一些实施方案中, 所述辅料是蔗糖。在一些实施方案中, 蔗糖浓度为 $5.5\% \pm 0.5\%$ 至 $9\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在某些实施方案中, 蔗糖浓度为 $5.8\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在一些实施方案中, 蔗糖浓度为 $5.8\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在一些实施方案中, 蔗糖浓度为 $6.0\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在一些实施方案中, 蔗糖浓度为 $6.5\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在一些实施方案中, 蔗糖浓度为 $7.0\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在一些实施方案中, 蔗糖浓度为 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v)。

在一些实施方案中，所述辅料是海藻糖。在一些实施方案中，海藻糖浓度为 $5.5\% \pm 0.5\%$ 至 $9\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在某些实施方案中，海藻糖浓度为 $7.0\% \pm 0.5\%$ 至 $9.0\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在一些实施方案中，海藻糖浓度为 $7.0\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在一些实施方案中，海藻糖浓度为 $8.0\% \pm 0.5\%$ (w/v)。在一些实施方案中，海藻糖浓度为 $9.0\% \pm 0.5\%$ (w/v)。

在一些实施方案中，所述辅料是脯氨酸。在一些实施方案中，脯氨酸浓度为 200mM 至 300mM。在某些实施方案中，脯氨酸浓度为 200mM 至 250mM。在一些实施方案中，脯氨酸浓度为 230mM。

在一些实施方案中，用于本发明的制剂中的缓冲液可以将本发明的制剂的 pH 控制在大约 4.7-6.1 的范围，优选大约 5.0-6.0，更优选约 5.0-5.5，最优选为 5.3 ± 0.1 。在一些具体的实施方案中，本发明的抗体制剂具有约 4.7、5.0、5.2、5.3、5.4、5.5、6.0、6.1、6.2、6.5 的 pH 值。

在本发明优选的实施方案中，本发明的液体制剂中的表面活性剂是聚山梨酯，诸如聚山梨酯-20、聚山梨酯-80、聚山梨酯-60、或聚山梨酯-40；普洛尼克等。在一个优选实施方案中，本发明的液体制剂中包含聚山梨酯-80 作为表面活性剂。在另一个优选实施方案中，本发明的液体制剂中包含聚山梨酯-20 作为表面活性剂。

在一个实施方案中，所述液体制剂是胃肠外给药制剂，优选为注射剂，更优选为皮下注射剂或静脉内注射剂。在一个实施方案中，所述液体制剂为静脉输注剂。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含：

- (a) $20 \text{ mg/ml} \pm 2 \text{ mg/ml}$ 至 $200 \text{ mg/ml} \pm 20 \text{ mg/ml}$ 抗体，
- (b) 包含 $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 至 $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ 组氨酸或醋酸的缓冲液，
- (c) $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨酯，和
- (d) $6.5\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖或海藻糖，或 200mM 至 300mM 脯氨酸，pH 为 4.7 至 6.0。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含：

- (a) $20 \text{ mg/ml} \pm 2 \text{ mg/ml}$ 抗体，
- (b) 包含 $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 至 $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ 组氨酸或醋酸的缓冲液，
- (c) $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨酯，和
- (d) $6.5\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖或海藻糖，pH 为 5.3 ± 0.5 。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含：

- (a) $60 \text{ mg/ml} \pm 6 \text{ mg/ml}$ 抗体，
- (b) 包含 $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 至 $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ 组氨酸或醋酸的缓冲液，
- (c) $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨酯，和
- (d) $6.5\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖或海藻糖，pH 为 5.3 ± 0.5 。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含：

- (a) $100 \text{ mg/ml} \pm 10 \text{ mg/ml}$ 抗体，

- (b) 包含 $5\text{ mM} \pm 1\text{ mM}$ 至 $20\text{ mM} \pm 4\text{ mM}$ 组氨酸或醋酸的缓冲液,
 - (c) $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨酯, 和
 - (d) $6.5\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖或海藻糖,
- pH 为 5.3 ± 0.5 。

在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂包含:

- (a) $150\text{ mg/ml} \pm 15\text{ mg/ml}$ 抗体,
 - (b) 包含 $5\text{ mM} \pm 1\text{ mM}$ 至 $20\text{ mM} \pm 4\text{ mM}$ 组氨酸或醋酸的缓冲液,
 - (c) $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨酯, 和
 - (d) $6.5\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖或海藻糖,
- pH 为 5.3 ± 0.5 。

本发明的液体制剂可以长期稳定储存, 例如至少 24 个月或更长时间。在一个实施方案中, 本发明的液体制剂可以在约 -80°C 至约 45°C , 例如 -80°C 、约 -30°C 、约 -20°C 、约 0°C 、约 5°C 、约 25°C 、约 35°C 、约 38°C 、约 40°C 、约 42°C 或约 45°C 的条件下, 储存至少 10 天、至少 20 天、至少 1 个月、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 7 个月、至少 8 个月、至少 9 个月、至少 10 个月、至少 11 个月、至少 12 个月、至少 18 个月、至少 24 个月, 至少 36 个月, 或更长时间, 且是稳定的。

在一些实施方案中, 本发明的液体制剂具有 $2\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$ 的平均粒径, 如通过微流成像系统 (MFI) 所测定的。

在一些实施方案中, 本发明的液体制剂具有 $250\text{-}350\text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$ 之间的质量渗透压摩尔浓度。

在一些实施方案中, 本发明的液体制剂具有约 1.0 厘泊-30 厘泊的粘度, 例如约 1.0 厘泊-10 厘泊的粘度。在一个实施方案中, 所述液体制剂在 25°C 的粘度为约 1.0 厘泊-20 厘泊。在一个实施方案中, 所述液体制剂在 25°C 的粘度为约 1.0 厘泊-10 厘泊。在一个实施方案中, 所述液体制剂在 25°C 的粘度为约 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 或 10.0 厘泊。在一个实施方案中, 所述液体制剂在 $4\text{-}40^\circ\text{C}$ 的粘度为约 5.0 厘泊-7.0 厘泊。在一个实施方案中, 所述液体制剂在 $4\text{-}40^\circ\text{C}$ 的粘度为约 6.8 厘泊。在一个实施方案中, 所述液体制剂在 25°C 的粘度为约 6.8 厘泊。

在一个实施方案中, 本发明的液体制剂可以稳定储存至少 24 个月。在再一实施方案中, 本发明的液体制剂在 -80°C 至 45°C 之间的任何温度下是稳定的。在再一实施方案中, 本发明的液体制剂在约 2°C - 8°C 保持稳定至少 3 个月, 优选至少 12 个月, 更优选至少 24 个月, 最优选至少 36 个月。在一个实施方案中, 本发明的液体制剂在室温或例如约 25°C 保持稳定至少 2 个月, 优选至少 3 个月, 更优选至少 6 个月, 最优选至少 12 个月。在再一实施方案中, 本发明的液体制剂在约 40°C 保持稳定至少 2 周、优选至少 1 个月、更优选至少 6 周、最优选至少 8 周。所述稳定例如表现为例如溶解状态下的抗体单体纯度超过 95%, 优选 98%, 更优选 99%。

在一个实施方案中, 可以通过检测制剂的外观、可见异物、蛋白含量、单体纯度、和/或电

荷变异体的变化, 来指示储存后制剂的稳定性。在一个实施方案中, 可以在高温胁迫的强制实验中, 例如在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存至少 1 周、2 周或优选地 1 个月后, 或在加速实验中, 例如在 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存至少 1 个月或 2 个月后, 或在长期实验中, 例如在 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存至少 6 个月或 12 个月后, 检测本发明液体制剂的稳定性。所述稳定例如表现为溶解状态下的抗体单体纯度超过 95%, 优选 98%, 更优选 99%。

在一个实施方案中, 在储存后, 通过目视检查本发明液体制剂的稳定性, 其中本发明液体制剂在外观上保持为澄清至微乳光, 为无色至淡黄色液体, 且无异物。在一个实施方案中, 在澄明度检测仪下目视检查, 制剂中无可见异物存在。在一个实施方案中, 检测制剂在约 405 nm 或约 350 nm 处的吸光度以测定溶液混浊度。在一个实施方案中, 通过测定蛋白在升温过程中发生构型变化或聚集而使得粒径发生变化时的转变温度 T_{onset} , 检查本发明液体制剂的稳定性, 优选 T_{onset} 高于 60°C 、 63°C 、 65°C 、 68°C 或 70°C 。在一个实施方案中, 在储存后, 通过测定蛋白含量变化, 检查本发明液体制剂的稳定性, 相对于储存第 0 天的初始值, 蛋白含量变化率不超过 10%, 优选不超过 5%。在一个实施方案中, 在储存后, 通过测定本发明液体制剂中抗体的单体纯度变化, 检查本发明液体制剂的稳定性, 其中通过体积排阻高效液相色谱法 (SEC-HPLC), 相对于储存第 0 天的初始值, 单体纯度的变化值不超过 10%, 例如不超过 5%、4%、3%、例如变化值不超过 1-2%, 优选不超过 1%。在另一个实施方案中, 在储存后, 通过非还原型和/或还原型十二烷基硫酸钠毛细管电泳 (CE-SDS) 法, 单体纯度的变化值下降不超过 10%, 例如不超过 5%、4%、3%。在一个实施方案中, 在储存后, 通过全柱成像毛细管等电聚焦电泳法 (icIEF) 或阳离子交换高效液相色谱法 (CEX-HPLC) 检测本发明液体制剂的稳定性, 其中相对于储存第 0 天的初始值, 抗体的电荷变异体 (主成分、酸性组分和碱性组分) 的变化值总和不超过 50%, 例如不超过 40%、30%、20%、10%、5%。

在一些实施方案中, 制剂在储存后, 例如在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 储存至少 24 个月后, 或在室温储存至少 3 个月后, 或在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存 1 个月后, 是稳定的, 优选地具有如下特征之一或多项:

(i) 通过 SEC-HPLC 法测量, 制剂具有大于 90% 的抗体单体纯度, 优选大于 95%、96%、97%、98%、99% 的纯度;

(ii) 通过还原型或非还原型 CE-SDS 法 (例如, 非还原型 CE-SDS) 测量, 制剂具有大于 90% 的抗体单体纯度, 优选大于 92%、94%、96%、98% 的纯度;

(iii) 通过 icIEF 或 CEX 法测量, 相对于储存第 0 天的初始值, 制剂中抗体蛋白的各组分 (主成分、酸性组分和碱性组分) 的变化值总和不超过 50%, 例如不超过 40%、30%、20%、10%、5%。

在一些实施方案中, 制剂在振摇后 (例如, 振摇 14 天后), 搅拌后 (例如, 搅拌 6 小时后), 光照后 (例如, 光照 3 天后), 和/或冻融后 (例如, 经 5 轮冻融后), 是稳定的, 优选地具有如下特征之一或多项:

(i) 通过 SEC-HPLC 法测量, 制剂具有大于 90% 的抗体单体纯度, 优选大于 95%、96%、97%、98%、99% 的纯度;

(ii)通过还原型或非还原型 CE-SDS 法(例如,非还原型 CE-SDS)测量,制剂具有大于 90% 的抗体单体纯度,优选大于 92%、94%、96%、98% 的纯度;

(iii)通过 iCIEF 或 CEX 法测量,相对于储存第 0 天的初始值,制剂中抗体蛋白的各组分(主成分、酸性组分和碱性组分)的变化值总和不超过 50%,例如不超过 40%、30%、20%、10%、5%。

在本发明的优选实施方案中,本发明的制剂具有高的抗体浓度,同时其具有适合给药尤其皮下给药的低粘度,具有高的物理和化学稳定性,存放时不易产生聚集体和颗粒并且较不易发生电荷异质性变化。这些优点对于生产完全、有效、高一致性的临床药品是十分有益的。

在一个方面,本发明提供了一种递送装置,其包含本发明的液体抗体制剂。在一个实施方案中,本发明的递送装置以包含本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂的预填充注射器形式提供,例如用于静脉内、皮下、皮内或者肌肉注射、静脉内输注。

在又一方面,本发明提供向受试者,例如哺乳动物,例如人,施用抗体的方法,包括给予所述受试者本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂的步骤,所述递送是例如通过使用预填充注射器的递送装置实施的。

在又一方面,本发明提供本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂用于制备在受试者中治疗、预防或延缓与.....相关的病症的递送装置(如,预填充注射器)或药物的用途,所述病症例如.....。

在一些实施方案中,药物制剂包含:(a) 20 mg/ml \pm 2 mg/ml 抗体,(b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液,(c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯,和 (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖,pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一些实施方案中,药物制剂包含:(a) 20 mg/ml \pm 2 mg/ml 抗体,(b) 包含 10 mM \pm 2 mM 组氨酸的缓冲液,(c) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯,和 (d) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖,pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中,药物制剂包含:(a) 20 mg/ml \pm 2 mg/ml 抗体,(b) 0.175 mg/ml L-组氨酸,(c) 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物,(d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯,和 (e) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖,pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中,药物制剂包含:(a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体,(b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液,(c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯,和 (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖,pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一些实施方案中,药物制剂包含:(a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体,(b) 包含 10 mM \pm 2 mM 组氨酸缓冲体系的缓冲液,(c) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯,和 (d) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖,pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中,药物制剂包含:(a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体,(b) 0.175 mg/ml L-组氨酸,(c) 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物,(d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯,和 (e) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖,pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中,药物制剂包含:(a) 100 mg/ml \pm 10 mg/ml 抗体,(b) 包含 5 mM \pm 1

mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液, (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖, pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 100 mg/ml \pm 10 mg/ml 抗体, (b) 包含 10 mM \pm 1 mM 组氨酸缓冲体系的缓冲液, (c) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (d) 7.0% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖, pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 100 mg/ml \pm 10 mg/ml 抗体, (b) 0.175 mg/ml L-组氨酸, (c) 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物, (d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (e) 7.0% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖, pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 150 mg/ml \pm 15 mg/ml 抗体, (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液, (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖, pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 150 mg/ml \pm 15 mg/ml 抗体, (b) 包含 10 mM \pm 1 mM 组氨酸缓冲体系的缓冲液, (c) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (d) 7.0% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖, pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 150 mg/ml \pm 15 mg/ml 抗体, (b) 0.175 mg/ml L-组氨酸, (c) 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物, (d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (e) 7.0% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖, pH 为 5.3 \pm 0.1。

在这些实施例中的任一者中, 聚山梨酯可为聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20, 优选聚山梨酯 80。

在一个方面中, 本发明提供了一种药物组合物, 其中所述组合物包含如上文或本文所论述的药物制剂, 且所述组合物容纳于容器中。在一些实施方案中, 容器为小瓶。在一些情况下, 小瓶为 2 ml、5 ml、10 ml 或 20 ml 的 1 型透明玻璃小瓶。在一些实施方案中, 容器为注射器。在一些情况下, 注射器为低钨玻璃。在一些实施方案中, 容器为预填充注射器。在一些实施方案中, 组合物容纳于自动注射器中。

在一个方面中, 本发明提供了一种试剂盒, 其包含 (i) 含有包含如上文或本文所论述的药物制剂的组合物容器, 和使用所述组合物的说明书。在一些实施方案中, 容器为玻璃小瓶。在一些实施方案中, 容器为预填充注射器。在一些实施方案中, 容器为自动注射器。

在一个方面中, 本发明提供了包含如上文或本文所论述的药物制剂的单位剂型, 其中抗体以 0.1 mg 至 500 mg 的量存在。在一些情况下, 抗体以 200-400mg 的量存在。在一些实施方案中, 单位剂型为玻璃小瓶, 例如西林瓶。在一些实施方案中, 单位剂型为预填充注射器。在一些实施方案中, 单位剂型为自动注射器。

在上文或本文所论述的药物组合物、试剂盒或单位剂型中的任一者中, 含有药物制剂的容器可包含顶隙, 所述顶隙包含气体, 其中所述气体包含小于 5 体积% 的氧气。在一些情况下, 气体包含小于 1 体积% 的氧气。在一些情况下, 气体包含不超过 0.1 体积% 的氧气。

在一个方面中, 本发明提供含有药物组合物的容器, 其中所述组合物包含如上文或本文中所述论述的药物制剂。在一些情况下, 容器为注射器。在一些情况下, 容器为预填充注射器。在

一些情况下，容器为自动注射器。在一些情况下，容器为玻璃小瓶。

在各种实施例中，上文或本文所论述的实施例的特征或组分中的任一者可组合，且此类组合涵盖于本发明案的范围。上文或本文所论述的任何具体值可与上文或本文所论述的另一相关值组合以叙述范围，其中所述值表示所述范围的上端和下端，且此类范围和属于此类范围内的所有值涵盖于本发明案的范围。上文或本文所论述的值中的每一者可表示为具有 1%、5%、10%或 20%的变化。举例来说，10 mM 浓度可表示为 $10\text{ mM} \pm 0.1\text{ mM}$ (1%变化)、 $10\text{ mM} \pm 0.5\text{ mM}$ (5%变化)、 $10\text{ mM} \pm 1\text{ mM}$ (10%变化) 或 $10\text{ mM} \pm 2\text{ mM}$ (20%变化)。

二、本发明的抗 MASP-2 抗体

在一个方面中，本发明提供结合 MASP-2 或其片段（优选人 MASP-2 蛋白）的抗 MASP-2 抗体或抗体片段（优选抗原结合片段）。

在一些实施方案中，本发明提供了新型单克隆抗MASP-2抗体及其片段。

在一个方面，本发明提供了特异性结合MASP-2的分离的抗体或其抗原结合片段，其中该抗体或其抗原结合片段表现出以下一个或多个特征：a) 与小鼠或大鼠没有交叉反应；b) 与 OMS721相比，在猴体内具有更长的血清半衰期；c) 与C1s、C1r、MASP1或MASP3没有交叉反应；d) 能够选择性地阻断MBL途径的补体激活；e) 能够与人MASP-2特异性结合，其 K_D 值不超过27.8 nM（或不超过25 nM、20 nM、15 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM、0.01 nM、0.009 nM、0.008 nM、0.007 nM、0.006 nM、0.005 nM、0.004 nM、0.003 nM、0.002 nM，或0.001 nM），如由Bio-Layer Interferometry所测量的；f) 能够阻断补体C3的激活，在1%的人血清中通过ELISA测定其 IC_{50} 不超过0.08 $\mu\text{g/mL}$ （或不超过0.07 $\mu\text{g/mL}$ 、0.06 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.04 $\mu\text{g/mL}$ 、0.03 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 或0.01 $\mu\text{g/mL}$ ），或在10%的人血清中通过ELISA测定其 IC_{50} 不超过0.20 $\mu\text{g/mL}$ （或不超过0.15 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.09 $\mu\text{g/mL}$ 、0.08 $\mu\text{g/mL}$ 、0.07 $\mu\text{g/mL}$ 、0.06 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.04 $\mu\text{g/mL}$ 、0.03 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、或0.01 $\mu\text{g/mL}$ ）；g) 能够在50%人血清中阻断补体C3的激活；h) 能够阻断补体C4的激活，在2%的人血清中通过ELISA测定其 IC_{50} 不超过0.11 $\mu\text{g/mL}$ （或不超过0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.09 $\mu\text{g/mL}$ 、0.08 $\mu\text{g/mL}$ 、0.07 $\mu\text{g/mL}$ 、0.06 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.04 $\mu\text{g/mL}$ 、0.03 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ ，或0.01 $\mu\text{g/mL}$ ），或在10%的人血清中通过ELISA测定其 IC_{50} 不超过0.69 $\mu\text{g/mL}$ （或不超过0.65 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.55 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.45 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.35 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、或 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.15 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.09 $\mu\text{g/mL}$ 、0.08 $\mu\text{g/mL}$ 、0.07 $\mu\text{g/mL}$ 、0.06 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.04 $\mu\text{g/mL}$ 、0.03 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、或 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ）；i) 能够阻断MAC的形成，在2%的人血清中通过ELISA测定其 IC_{50} 不超过0.27 $\mu\text{g/mL}$ （或不超过0.25 $\mu\text{g/mL}$ ，或0.2 $\mu\text{g/mL}$ ，0.15 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.09 $\mu\text{g/mL}$ 、0.08 $\mu\text{g/mL}$ 、0.07 $\mu\text{g/mL}$ 、0.06 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.04 $\mu\text{g/mL}$ 、0.03 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、或 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ）。

在一个方面，本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段，包含：

包含DYYIN（SEQ ID NO: 1）的氨基酸序列的重链CDR1，

包含WIFPGSX₁ SX₂ YX₃ X₄ X₅ X₆ FX₇ X₈ (SEQ ID NO: 2)的氨基酸序列的重链CDR2, 和包含GDRSGPFX₉ Y (SEQ ID NO: 3)的氨基酸序列的重链CDR3; 和/或包含KSSQSLLYSNGKTYLN (SEQ ID NO: 4)的氨基酸序列的轻链CDR1, 包含LVSKLDS (SEQ ID NO: 5)氨基酸序列的轻链CDR2, 和包含VQX₁₀ THFPFT (SEQ ID NO: 6)的氨基酸序列的轻链CDR3。

其中X₁是E、D或G, X₂是A或P, X₃是H或Y, X₄是S或N, X₅是E或Q, X₆是K或N, X₇是K或Q, X₈是A或G, X₉是A或P, 和X₁₀是V或G。

在某些实施方案中, 该抗体或其抗原结合片段包含:

包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链CDR1, 和/或

包含选自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的重链CDR2, 和/或

包含选自SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12的氨基酸序列的重链CDR3; 和/或

包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR1, 和/或

包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的轻链CDR2, 和/或

包含选自SEQ ID NO: 13和SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的轻链CDR3。

在一个方面, 本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链CDR1, 包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的重链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的重链CDR3; 或

包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链CDR1, 包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的重链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 12的氨基酸序列的重链CDR3; 或

包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链CDR1, 包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的重链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的重链CDR3; 或

包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链CDR1, 包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的重链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的重链CDR3。

在某些实施方案中, 该抗体或其抗原结合片段进一步包含:

包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR1, 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的轻链CDR2, 和包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR3; 或

包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR1, 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的轻链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的轻链CDR3。

在某些实施方案中, 该抗体或其抗原结合片段包含:

包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链CDR1, 包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的重链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的重链CDR3, 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR1, 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的轻链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR3; 或。

包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链CDR1, 包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的重链CDR2,

以及包含SEQ ID NO: 12的氨基酸序列的重链CDR3, 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR1, 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的轻链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR3; 或

包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链CDR1, 包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的重链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的重链CDR3, 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR1, 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的轻链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的轻链CDR3; 或

包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链CDR1, 包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的重链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的重链CDR3, 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR1, 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的轻链CDR2, 以及包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR3。

在某些实施方案中, 该抗体或其抗原结合片段包含:

包含SEQ ID NO: 15的氨基酸序列或与其具有至少80%同一性的序列的重链可变区;

包含SEQ ID NO: 17的氨基酸序列或与其具有至少80%同一性的序列的重链可变区;

包含SEQ ID NO: 18的氨基酸序列或与其具有至少80%同一性的序列的重链可变区;

包含SEQ ID NO: 20的氨基酸序列或与其具有至少80%同一性的序列的重链可变区;

包含SEQ ID NO: 22的氨基酸序列或与其具有至少80%同一性的序列的重链可变区;

包含SEQ ID NO: 24的氨基酸序列或与其具有至少80%同一性的序列的重链可变区; 或

包含SEQ ID NO: 26的氨基酸序列或与其具有至少80%同一性的序列的重链可变区。

在某些实施方案中, 该抗体或其抗原结合片段包含:

包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列, 或具有至少80%同一性的序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 19的氨基酸序列, 或具有至少80%同一性的序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 28的氨基酸序列, 或具有至少80%同一性的序列的轻链可变区; 或

包含SEQ ID NO: 30的氨基酸序列, 或具有至少80%同一性的序列的轻链可变区。

在某些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区, 所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 26具有至少80%序列同一性的氨基酸序列和/或轻链可变区包含与SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 28或SEQ ID NO: 30具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

在某些实施方案中, 该抗体或其抗原结合片段包含:

包含SEQ ID NO: 15的氨基酸序列的重链可变区, 以及包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 17的氨基酸序列的重链可变区, 和包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 18的氨基酸序列的重链可变区, 和包含SEQ ID NO: 19的氨基酸序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 20的氨基酸序列的重链可变区, 和包含SEQ ID NO: 28的氨基酸序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 20的氨基酸序列的重链可变区, 和包含SEQ ID NO: 30的氨基酸序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 22的氨基酸序列的重链可变区, 和包含SEQ ID NO: 28的氨基酸序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 22的氨基酸序列的重链可变区, 和包含SEQ ID NO: 30的氨基酸序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 24的氨基酸序列的重链可变区, 以及包含SEQ ID NO: 28的氨基酸序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 24的氨基酸序列的重链可变区, 以及包含SEQ ID NO: 30的氨基酸序列的轻链可变区;

包含SEQ ID NO: 26的氨基酸序列的重链可变区, 和包含SEQ ID NO: 28的氨基酸序列的轻链可变区; 或

包含SEQ ID NO: 26的氨基酸序列的重链可变区, 以及包含SEQ ID NO: 30的氨基酸序列的轻链可变区。

在某些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段进一步包含一个或多个氨基酸残基突变, 但仍保留对MASP-2的特定结合亲和力。在某些实施方案中, 至少有一个突变是保守取代, 或所有的突变都是保守取代。在某些实施方案中, 至少一个突变是发生在CDR序列中的一个或多个位置, 和/或在重链可变区或轻链可变区的非CDR序列中的一个或多个位置。

在某些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段进一步包含免疫球蛋白恒定区, 可选地包含IgG的重链恒定区, 和/或轻链恒定区。在某些实施方案中, 恒定区包括小鼠恒定区、兔恒定区或人恒定区, 任选地恒定区包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。在某些实施方案中, 重链恒定区包含相对于野生型人IgG恒定区在氨基酸残基252、254或256处的一个或多个氨基酸取代, 任选地, 氨基酸残基252处的氨基酸取代是被酪氨酸取代, 氨基酸残基254处的氨基酸取代是被苏氨酸取代, 氨基酸残基256处的氨基酸取代是被谷氨酸取代。在某些实施方案中, 重链恒定区包含与野生型人IgG恒定区氨基酸序列具有至少80%同一性的序列, 并且相对于野生型人IgG恒定区具有氨基酸残基252处被酪氨酸取代, 氨基酸残基254处被苏氨酸取代, 和氨基酸残基256处被谷氨酸取代。

在某些实施方案中, 所述抗MASP-2抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、重组抗体、嵌合抗体、人源化抗体、标记抗体、二价抗体、抗独特型抗体、融合蛋白、二聚或多聚抗体、或修饰的抗体(例如糖基化修饰的抗体)。

在某些实施方案中, 所述抗MASP-2抗体或其抗原结合片段是双体抗体(diabody)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')。二硫键稳定的双体抗体(ds diabody), 单链抗体分子(scFv), scFv二聚体(二价双体抗体),

多特异性抗体，骆驼单域抗体，纳米抗体，域抗体，或二价域抗体。

在某些实施方案中，抗体或其抗原结合片段特异性地与MASP-2结合，与C1s、C1r、MASP1或MASP3没有交叉反应。

在本发明的优选的实施方案中，所述抗MASP-2抗体或其抗原结合片段具有如下表所示的序列：

表1 小鼠抗MASP-2抗体和人源化129C10抗体的CDR序列

克隆		CDR1	CDR2	CDR3
129C10 小鼠/嵌合抗体，以及 129C10 HaLa/HaLb/ HbLa/HbLb	VH	SEQ ID NO: 1 DYYIN	SEQ ID NO: 7 WIFPGSESAYHSEKF KA	SEQ ID NO: 11 GDRSGPFAY
129C10 小鼠/嵌合抗体，以及 129C10 HaLa/HaLb/ HbLa/HbLb	VL	SEQ ID NO: 4 KSSQSLLYSNGKT YLN	SEQ ID NO: 5 LVSKLDS	SEQ ID NO: 13 VQVTHFPFT
160D10 小鼠/嵌合抗体	VH	SEQ ID NO: 1 DYYIN	SEQ ID NO: 9 WIFPGSDSAYYNEKF KG	SEQ ID NO: 12 GDRSGPFY
160D10 小鼠/嵌合抗体	VL	SEQ ID NO: 4 KSSQSLLYSNGKT YLN	SEQ ID NO: 5 LVSKLDS	SEQ ID NO: 13 VQVTHFPFT
125D5 小鼠/嵌合抗体	VH	SEQ ID NO: 1 DYYIN	SEQ ID NO: 10 WIFPGSGSPYYNENF KG	SEQ ID NO: 11 GDRSGPFAY
125D5 小鼠/嵌合抗体	VL	SEQ ID NO: 4 KSSQSLLYSNGKT YLN	SEQ ID NO: 5 LVSKLDS	SEQ ID NO: 14 VQGTHFPFT
129C10 HcLa, HcLb, HdLa, HdLb 抗体	VH	SEQ ID NO: 1 DYYIN	SEQ ID NO: 8 WIFPGSESAYHSQKF QG	SEQ ID NO: 11 GDRSGPFAY
129C10 HcLa, HcLb, HdLa, HdLb 抗体	VL	SEQ ID NO: 4 KSSQSLLYSNGKT YLN	SEQ ID NO: 5 LVSKLDS	SEQ ID NO: 13 VQVTHFPFT

表2 本发明的抗体序列

2-1 鼠抗体/嵌合抗体的可变区序列		
129C10 鼠 抗体/嵌合抗 体	HC	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 15): QVQLQQSGPELEKPGT SVKISCEASGYTFTD <u>DYYIN</u> WVQQR

		PGQGLEWIGWIFPGSESAYHSEKFKAKATLTVDTSSSTAY MLLTSLTSEDSAVYFCTRGRSGPFAYWGQGLTVTSA
129C10 鼠 抗体/嵌合抗 体	LC	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 16): DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWL LQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGADFTLKISR VEAEDLGVYYCVQVTHFPFTFGTGTKLEIK
160D10 鼠 抗体/嵌合抗 体	HC	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 17): QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQ RPGQGLEWVGWIFPGSDSAYYNEKFKGKATLTVDTSSSTA YMLLSSLTSEDSAVYFCARGDRSGPFYWGQGLTVTSA
160D10 鼠 抗体/嵌合抗 体	LC	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 16): DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWL LQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGADFTLKISR VEAEDLGVYYCVQVTHFPFTFGTGTKLEIK
125D5 鼠抗 体/嵌合抗体	HC	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 18): QVQLQQSGPDLVKPGTSVKISCTASGYTFTDYYINWVKQR PGQGLEWIGWIFPGSGSPYYNENFKGRAMFTVDYSSSSAY MLLSSLTSEDSAVYFCTRGRSGPFAYWGQGLTVTSA
125D5 鼠抗 体/嵌合抗体	LC	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 19): DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWL LQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGADFTLKISR VEAEDLGVYYCVQVTHFPFTFGTGTKLEIK
2-2 人源化 129C10 的可变区序列		
重链可变区 129C10	Ha	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 20): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVR QAPGQGLEWMGWIFPGSESAYHSEKFKARVTMTVDTSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCTRGRSGPFAYWGQGLTVTS S
重链可变区 人源化 129C10	Hb	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 22): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVR QAPGQGLEWMGWIFPGSESAYHSEKFKARATLTVDTSSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCTRGRSGPFAYWGQGLTVTS S
重链可变区 人源化 129C10	Hc	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 24): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVR QAPGQGLEWMGWIFPGSESAYHSQKFQGRVTMTVDTSIS TAYMELSRRLRSDDTAVYYCTRGRSGPFAYWGQGLTVT

		SS
重链可变区 人源化 129C10	Hd	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 26): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVR QAPGQGLEWMGWIFPGSEAYHSQKFQGRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCTR <u>GDRSGPFAYWGQGLVTVS</u> S
轻链可变区 人源化 129C10	La	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 28): DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW LQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS <u>GV</u> PDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYC <u>VQV</u> THFPFTFGQGTKLEIK
轻链可变区 人源化 129C10	Lb	氨基酸序列 (SEQ ID NO: 30): DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW LQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS <u>GV</u> PDRFSGSGSGADFTLKIS RVEAEDVGVYYC <u>VQV</u> THFPFTFGQGTKLEIK
2-3 129C10-hu-YTE 抗体的序列		
重链恒定区 IgG4 YTE		氨基酸序列 (SEQ ID NO: 35): ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK
轻链恒定区 IgG4		氨基酸序列 (SEQ ID NO: 34): RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

<p>Hu129C10 抗体重链 (hIgG4_YTE kappa)</p>	<p>HC</p>	<p>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 36): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVR QAPGQGLEWMGWIFPGSESAHSEKFKARVTMTVDTISIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCTRGRSGPFAYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK</p>
<p>Hu129C10 抗体轻链 (hIgG4_YTE kappa)</p>	<p>LC</p>	<p>氨基酸序列 (SEQ ID NO: 29): DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW LQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCVQVTHFPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

在某些实施方案中，本发明提供的抗体及其抗原结合片段是人源化的。人源化抗体或抗原结合片段在降低针对人的免疫原性方面具有优势。人源化抗体在其可变区是嵌合的，以非人的CDR序列嫁接到人FR序列（或基本上是人FR序列）。抗体或抗原结合片段的人源化基本上可以通过在人免疫球蛋白基因中用非人（如鼠）CDR基因替换相应的人CDR基因来实现（例如，参见Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536）。在一些实施方案中，本文提供的人源化抗体或抗原结合片段基本全部由人序列组成，除了CDR序列是非人的。在某些实施方案中，可变区FR和恒定区（如果有）完全或基本上完全来自人免疫球蛋白序列。人FR序列和人恒定区序列可以来自不同的人免疫球蛋白基因，例如，FR序列来自一个人的抗体，恒定区来自另一个人的抗体。在一些实施方案中，人源化抗体或抗原结合片段包括人重/轻链FR1-4。

在某些实施方案中，本发明提供的人源化抗体及其抗原结合片段包含人胚系框架序列VH/1-2的一个或多个重链FR序列，和/或人胚系框架序列VK/2-30的一个或多个轻链FR序列，有或没有回复突变。可以根据需要在人胚系框架序列中引入回复突变。在某些实施方案中，本发明的人源化抗体129C10可以包含一个或多个选自下组的突变：在重链框架序列VH/1-2中的R71V, A93T, V67A和M69L（基于Kabat编号），和/或重链CDR2中的A65G, K64Q, E61Q（基于Kabat编号）。人源化抗体129C10可以包含一个或多个选自下组的回复突变：轻链框架序列VK/2-30中的F36L和T69A（基于Kabat编号）。

在某些实施方案中，本文提供的抗体及其抗原结合片段的人源化重链和轻链在人体内基本

上没有免疫原性，并保持与MASP-2的母体抗体基本相同或甚至更高的亲和力。

在一些实施方案中，本文所述的抗MASP-2抗体是人抗体。可使用本领域中已知的各种技术来制备人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel, Curr.Opin.Pharmacol 5 : 368-74(2001)以及Lonberg, Curr.Opin.Immunol 20 : 450-459(2008)。

在一些实施方案中，本文所述的抗MASP-2抗体是嵌合抗体。

三、本发明抗体或其制剂的治疗方法和用途

本发明还提供了治疗方法，包括将治疗有效量的本发明的抗体或抗原结合片段，或本发明的抗体药物制剂，或本发明的药物组合物、试剂盒或单位剂型施用于需要的受试者，从而治疗或预防MASP-2依赖性补体激活相关疾病或病症。

本发明提供了在需要的受试者中通过抑制MASP-2而抑制MASP-2依赖性补体激活的方法，或治疗或预防与MASP-2依赖性补体激活相关的病症或疾病的方法，这些方法包括向受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或抗原结合片段，或本发明的抗体药物制剂，或本发明的药物组合物、试剂盒或单位剂型。

在另一个方面，本发明提供了治疗受试者中受益于抑制MASP-2依赖性补体激活的病症的方法，包括将治疗有效量的本文提供的抗体或抗原结合片段，或本发明的抗体药物制剂，或本发明的药物组合物、试剂盒或单位剂型施用于需要的受试者。

在另一个方面，本发明进一步提供了降低受试者血清C4水平的方法，包括向受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段，或本发明的抗体药物制剂，或本发明的药物组合物、试剂盒或单位剂型，从而降低受试者的血清C4的水平。

在另一个方面，本发明进一步提供了一种治疗受试者的病症的方法，其中所述病症将受益于受试者血清C4水平的降低，包括向受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段，或本发明的抗体药物制剂，或本发明的药物组合物、试剂盒或单位剂型，从而治疗该病症。

在另一个方面，本发明进一步提供了治疗或预防与血清C4水平异常（例如升高）相关的病症或疾病的方法，包括向受试者施用治疗有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段，或本发明的抗体药物制剂，或本发明的药物组合物、试剂盒或单位剂型，从而治疗所述病症或疾病。

在某些实施方案中，所述方法进一步包括施用第二种治疗剂。

在某些实施方案中，受试者是人。在某些实施方案中，给药是通过口服、鼻饲、静脉注射、皮下注射、舌下注射或肌肉注射。

在一个方面，本发明进一步提供了本发明提供的抗体或其抗原结合片段，或本发明的抗体药物制剂，或本发明的药物组合物、试剂盒或单位剂型在制造药剂中的用途，其中所述药剂用于以下中的一者或多者：

- (1) 用于抑制MASP-2依赖性补体激活；
- (2) 用于治疗或预防MASP-2依赖性补体激活相关疾病或病症；
- (3) 用于治疗受试者中受益于抑制MASP-2依赖性补体激活的病症；

- (4) 用于降低受试者血清C4水平;
- (5) 用于治疗受试者中受益于受试者血清C4水平的降低的病症;
- (6) 用于治疗或预防与血清C4水平异常(例如升高)相关的病症或疾病。

在一些实施方案中, 前述任何疾病或病症包括自身免疫性疾病、血管病症、缺血再灌注损伤、动脉硬化、炎症、肺部病症、体外再灌注过程、肌肉骨骼病症、肾脏病症、皮肤病症、器官或组织移植过程、神经系统疾病或损伤、血液疾病、泌尿生殖系统疾病、非肥胖型糖尿病或与1型或2型糖尿病相关并发症、癌症、内分泌疾病、眼科疾病或COVID-19(新冠肺炎)。

在一些具体的实施方案中, 所述自身免疫性疾病包括血栓性微血管病(TMA)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、造血移植相关的血栓性微血管病(TA-TMA)、狼疮肾炎、系统性红斑狼疮(SLE)和IgA肾病。

在一些具体的实施方案中, 所述血管病症包括心血管病症、脑血管病症、外周(如肌肉骨骼)血管病症、肾血管病症、肠系膜/肠道血管病症、移植物和/或再移植物的血管再生、血管炎、亨-舍二氏紫癜性肾炎、系统性红斑狼疮相关的血管炎、与类风湿性关节炎相关的血管炎、免疫复合物血管炎、大动脉炎、扩张型心肌病、糖尿病血管病、川崎病(动脉炎)、静脉气体栓塞(VGE), 以及支架置入术、旋转动脉瘤切除术和经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)后的再狭窄。

在一些具体的实施方案中, 所述缺血再灌注损伤包括与主动脉瘤修复、心肺转流、与器官移植和/或肢体/手指再植有关的血管再吻合、卒中、心肌梗死和休克和/或外科手术后的血液动力学复苏有关的缺血再灌注损伤。

在一些具体的实施方案中, 所述炎症包括炎症性胃肠道疾病, 其包括胰腺炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征和憩室炎。

在一些具体的实施方案中, 所述肺部病症包括急性呼吸窘迫综合征、输血相关性急性肺损伤、缺血/再灌注急性肺损伤、慢性阻塞性肺病、哮喘、韦格纳肉芽肿病、抗肾小球基底膜病(Goodpasture病); 胎粪吸入综合征、闭塞性细支气管炎综合征、特发性肺纤维化、继发于烧伤的急性肺损伤、非心源性肺水肿、输血相关呼吸困难、肺气肿、囊性纤维化、SARS-CoV、MERS-CoV和SARS-CoV-2(Covid-19)相关疾病。

在一些具体的实施方案中, 所述体外循环再灌注过程包括血液透析、血浆去除术、白细胞去除术、体外膜氧合(ECMO)、肝素诱导体外膜氧合低密度脂蛋白沉淀(heparin-induced extracorporeal membrane oxygenation LDL precipitation, HELP)和心肺转流术(CPB)。

在一些具体的实施方案中, 所述肌肉骨骼病症包括骨关节炎、类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、痛风、神经性关节病、银屑病性关节炎、脊椎关节病、结晶性关节病和系统性红斑狼疮(SLE)。

在一些具体的实施方案中, 所述肾脏病症包括系膜增生型肾小球肾炎、膜性肾小球肾炎、膜性增生性肾小球肾炎(系膜毛细血管性肾小球肾炎)、急性感染后肾小球肾炎(链球菌感染后肾小球肾炎)、冷球蛋白血症性肾小球肾炎、狼疮性肾炎、亨-舍二氏紫癜性肾炎和IgA肾病。

在一些具体的实施方案中，所述皮肤病症包括银屑病、自身免疫性大疱性皮肤病、嗜酸性海绵形成、大疱性类天疱疮、获得性大疱性表皮松解、妊娠疱疹、热烧伤和化学烧伤。

在一些具体的实施方案中，所述器官或组织移植过程包括器官异体移植、器官异种移植器官和组织移植。

在一些具体的实施方案中，所述神经系统疾病或损伤包括多发性硬化症、重症肌无力、亨廷顿氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化、格林巴利综合征、卒中后再灌注（reperfusion following stroke）、退变性椎间盘、脑外伤、帕金森氏病、阿尔茨海默病、Miller-Fisher 综合征、脑外伤和/或出血、脱髓鞘和脑膜炎。

在一些具体的实施方案中，所述血液病包括败血症、严重败血症、败血症休克、败血症引起的急性呼吸窘迫综合症、全身炎症反应综合症、失血性休克、溶血性贫血、自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜和溶血性尿毒综合症。

在一些具体的实施方案中，所述泌尿生殖系统病症包括疼痛性膀胱病、感觉性膀胱病、慢性非细菌性膀胱炎、间质性膀胱炎、不孕症、胎盘功能障碍和流产和先兆子痫。

在一些具体的实施方案中，所述内分泌疾病包括桥本氏甲状腺炎、压力、焦虑和激素性疾病，涉及垂体的催乳素、生长素或其他胰岛素样生长因子和促肾上腺皮质激素的调节性释放。

在一些具体的实施方案中，所述眼科疾病包括年龄相关性黄斑变性。

本发明的治疗方法包含向个体施用包含如本发明的特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段的任何制剂、药物组合物或单位剂型。施用药物制剂的个体可为例如需要此类治疗的任何人类或非人类动物。

四、其它

在一方面，本发明提供了编码以上任何抗 MASP-2 抗体或其片段的核酸。在一个实施方案中，提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体。在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在另一个实施方案中，宿主细胞是原核的。

在一个实施方案中，本发明提供制备抗 MASP-2 抗体或其片段（优选的抗原结合片段）的方法，其中所述方法包含在适于表达编码所述抗体或其片段（优选的抗原结合片段）的核酸的条件下培养所述宿主细胞，以及任选地分离所述抗体或其片段（优选地抗原结合片段）。在某个实施方案中，所述方法还包括从宿主细胞回收抗 MASP-2 抗体或其片段（优选地抗原结合片段）。

在一方面中，本发明涉及检测样品中 MASP-2 蛋白的方法，所述方法包括(a)将样品与本发明所述的任何抗 MASP-2 抗体制剂或本发明的抗体接触；和(b)检测抗 MASP-2 抗体或其片段和 MASP-2 蛋白间的复合物的形成。在一个实施方案中，抗 MASP-2 抗体是被可检测地标记的。

本发明还涵盖本文所述的任何实施方案的任意组合。本文所述的任何实施方案或其任何组合适用于本文所述的发明的任何和所有制剂或抗 MASP-2 抗体或其片段、方法和用途。

附图说明

图1显示MASP-2抗体阻断补体C3的激活。

图2显示MASP-2抗体阻断补体C4的激活。

图3显示MASP-2抗体阻断MAC的形成。

图4显示嵌合型和人源化MASP-2抗体阻断补体C3的激活。

图5显示MASP-2抗体129C10-hu和OMS721-analog在2%的人血清中阻断补体C4的激活。

图6显示MASP-2抗体129C10-hu和OMS721-analog在2%的人血清中阻断MAC的形成。

图7显示MASP-2抗体在1%人血清中阻断C3激活。

图8显示MASP-2抗体在10%人血清中阻断C3激活。

图9显示MASP-2抗体在50%的人血清中阻断C3的激活。

图10显示MASP-2抗体在10%的人血清中阻断C4的激活。

图11显示了MASP-2抗体129C10-hu与hMASP-2的亲合力动力学。

图12A-12E显示通过ELISA检测MASP-2抗体129C10-Hu与人C1s(12A)、C1r(12B)、MASP1(12C)、MASP3(12D)和MASP2(12E)的结合。

图13A-13B显示通过ELISA检测MASP-2抗体129C10-hu(13A)和OMS721-analog(13B)与人、食蟹猴、大鼠和小鼠MASP2的结合。

图14显示MASP-2抗体129C10-hu与食蟹猴MASP-2的交叉反应性。

图15显示MASP-2抗体129C10-hu中和三种补体激活途径的选择性。

图16A-16B显示MASP-2抗体129C10-hu-WT(16A)和129C10-hu-YTE(16B)与人FcRn的结合动力学曲线。

图17显示了MASP-2抗体129C10-hu-WT和129C10-hu-YTE在食蟹猴血清中的药代动力学(PK)结果。

图18A-18C显示了MASP-2抗体129C10-hu-WT和129C10-hu-YTE在食蟹猴血清中的PK和药效学(PD)结果。

图19显示了129C10-hu在第一次用药后对猴血清C4c的降低作用。

图20显示了129C10-hu在第四个剂量后对猴血清C4c的降低作用。

图21-图23涉及用于筛选制剂最适pH值的F12-F20处方于高温40℃条件下放置14天后的相关实验结果。图21所示为九个处方通过SEC检测HMW%的结果。图22所示为九个处方通过NRCE-SDS检测LMW%的结果。图23所示为九个处方通过CEX检测主峰、酸性峰和碱性峰的百分比的结果。

图24-图29涉及用于筛选最适辅料的F1-F5处方的相关实验结果。图24-图26分别为五个处方于高温40℃条件下放置14天后的SEC、NRCE-SDS和CEX结果。图27所示为各处方在振摇14天条件下的CEX结果。图28-29所示分别为各处方在搅拌6小时条件下的CEX、NRCE-SDS结果。

图 30-图 32 涉及用于筛选最适表面活性剂的 F6-F11 处方的相关实验结果。图 30 所示为六个处方于高温 40℃ 条件下放置 14 天后的 SEC 结果。图 31-32 所示分别为各处方在 100 rpm 搅拌 6 小时条件下通过 NR CE-SDS 和 CEX 检测稳定性结果。

图 33-图 44 涉及用于筛选最适处方的 F31-F37 处方的相关实验结果。图 33-35 分别为七个处方于高温 40℃ 条件下放置 4-6 周后的 SEC、NR CE-SDS 和 CEX 结果。图 36-38 分别为七个处方于 25℃ 条件下放置 4-6 周后的 SEC、NR CE-SDS 和 CEX 结果。图 39-41 分别为七个处方于光照 3 天条件下的 SEC、NR CE-SDS 和 CEX 结果。图 42-44 分别为七个处方于 200 rpm 振荡条件下处理 10 天的 SEC、NR CE-SDS 和 CEX 结果。

发明详述

定义

除非另外规定，否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。如本文所使用，当关于特定叙述数值或值范围使用时，本文所用的术语“约”将与其联用的数值浮动 $\pm 10\%$ 。举例而言，如本文所使用，表述“约 100”包括 90 和 110 和其间的的所有值（例如 90.5、95、101、105、109.95.....等）。对于比例而言，术语“约”用于限定所给出的比例的每个数字。例如，比例约 1:1 是指比例为 0.9 ~ 1.1:0.9 ~ 1.1。

尽管类似或等效于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料可以用于本发明的实践或测试中，但现描述示例性方法和材料。本说明书中所提及的所有专利、申请和非专利出版物均以全文引用的方式并入本文中。

本文所用的术语“患者”是指可受益于本发明的难溶性抗肿瘤活性剂的哺乳动物和非哺乳动物个体。哺乳动物是指哺乳类的任何成员，其包括但不限于：人；非人灵长类动物，如黑猩猩及其它猿类和猴类物种；农场动物，如牛、马、绵羊、山羊和猪；家畜，如兔、狗和猫；实验室动物，包括啮齿类动物，如大鼠、小鼠和豚鼠；等等。非哺乳动物的例子包括但不限于鸟等。术语“患者”并不限定特定的年龄或性别。在一些实施方案中，所述“患者”是人。

如无特别说明，本文中“施用”和“给药”可互换使用。

如本文所用，术语“按体积计的重量百分比”或“% w/v”表示单一组分相对于含有该组分的混合物的总体积的百分比重量（以克计）。例如，总体积 8ml 中的 500mg 组分为 6.25 % w/v，总体积 5ml 中的 500mg 组分为 10 % w/v。

本文所用的术语“抗体”包括任何与特定抗原结合的免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、二价抗体、单价抗体、多特异性抗体、或双特异性抗体。天然的完整抗体包含两条重链(H)和两条轻链(L)。哺乳动物的重链分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ，每个重链由一个可变区(V_H)和第一、第二和第三恒定区（分别为 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} ）组成。哺乳动物的轻链分为 λ 和 κ ，而每条轻链由一个可变区(V_L 代表 λ 轻链，或 V_K 代表 κ 轻链)和一个恒定区(C_L 代表 λ 轻链或 C_K 代表 κ 轻链)组成。抗体呈“Y”形，Y的茎部由两条重链的第二和第三恒定区组成，通过二硫键结合在一起。Y的每个臂包括一个重链的可变区和第一恒定区与一个轻链的可变区和恒定区结合。轻

链和重链的可变区负责抗原结合。两条链的可变区通常包含三个高度可变的环，称为互补性决定区(CDR)(轻链CDR包括LCDR1、LCDR2和LCDR3,重链CDR包括HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本文所公开的抗体和抗原结合片段的CDR边界可以按照Kabat、IMGT、Chothia或Al-Lazikani的惯例来定义或识别(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. *et al.*, J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. *et al.*, Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. *et al.*, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。三个CDR散布在四个被称为框架区(FR)的侧翼之间,后者比CDR更高度保守,形成一个支架来支持高变异环。重链和轻链的恒定区域不参与抗原结合,但表现出各种效应子功能。根据其重链恒定区的氨基酸序列,抗体分为不同的类别。抗体的五个主要类别或同型是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,它们的特点是分别包含 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链。几个主要的抗体类别又分为几个亚类,如IgG1(γ 1重链),IgG2(γ 2重链),IgG3(γ 3重链),IgG4(γ 4重链),IgA1(α 1重链),或IgA2(α 2重链)。

本文所用的术语"二价"是指具有两个抗原结合位点的抗体或抗原结合片段;术语"单价"是指仅具有一个单一抗原结合位点的抗体或抗原结合片段;而术语"多价"是指具有多个抗原结合位点的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段是二价的。

在本文中,"双特异性"抗体指的是一种人工抗体,它有来自两个不同的单克隆抗体的片段,能够与两个不同的表位结合。这两个表位可以出现在同一个抗原上,或者它们可以出现在两个不同的抗原上。

本文所用的术语"抗原结合片段"是指由抗体的包含1、2或3个CDR的一部分形成的抗体片段,或任何其他能够与抗原结合但不包含完整天然抗体结构的抗体片段。抗原结合片段的例子包括但不限于双体抗体diabody、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双体抗体(ds Diabody)。单链抗体分子(scFv),scFv二聚体(二价双体抗体),双特异性抗体,多特异性抗体,骆驼单域抗体,纳米抗体,域抗体和二价域抗体。抗原结合片段能够与母体抗体所结合的相同抗原结合。

"Fab"对于抗体而言,是指由一条轻链(包括可变区和恒定区)通过二硫键与一条重链的可变区和第一恒定区结合而成的抗体部分。

"Fab'"是指包括部分铰链区的Fab片段。

"F(ab')₂"是指Fab'的二聚体。"Fv"对于一个抗体来说指的是抗体的具有完整的抗原结合部位的最小片段。一个Fv片段由单个轻链的可变区和单个重链的可变区结合组成。

"dsFv"是指一个二硫键稳定的Fv片段,其单一轻链的可变区和单一重链的可变区之间的连接是二硫键。在一些实施方案中,"(dsFv)₂"或"(dsFv-dsFv)"包括三个肽链:两个V_H部分通过肽接头(例如长的柔性接头)连接并分别通过二硫桥与两个V_L部分结合。在一些实施方案中,dsFv-dsFv'是双特异性的,其中每个二硫键配对的重链和轻链具有不同的抗原特异性。

"单链Fv抗体"或"scFv"是指由一个轻链可变区和一个重链可变区直接或经由肽接头序列相互连接的工程抗体(Huston JS等, Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988))。

"Fc"对于抗体来说是指由第一重链的第二和第三恒定区通过二硫键与第二重链的第二和第三恒定区结合而成的抗体部分。抗体的Fc部分负责各种效应子功能,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC),但不具有抗原结合功能。

"单链Fv-Fc抗体"或"scFv-Fc"是指由连接到抗体Fc区的scFv组成的工程化抗体。

"骆驼单域抗体"、“重链抗体”或“HCAb”是指包含两个V_H结构域而没有轻链的抗体(Riechmann L. and Muyldermans S., *J Immunol Methods*. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., *J Biotechnol*. Jun;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; U.S. Patent No. 6,005,079)。重链抗体最初源自骆驼科(骆驼、单峰驼和美洲驼)。虽然没有轻链,但骆驼化的抗体有可靠的抗原结合区(Hamers-Casterman C. *et al.*, *Nature*. Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. *et al.* "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," *Immunogenetics*. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. *et al.* *Immunology*. May;109(1):93-101 (2003)。重链抗体的可变结构域(VHH结构域)代表了由适应性免疫反应产生的最小的已知抗原结合单元(Koch-Nolte F. *et al.*, *FASEB J*. Nov;21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007))。

"纳米抗体"是指由一个重链抗体的VHH结构域和两个恒定结构域(CH2和CH3)组成的抗体片段。

"双体抗体"或"dAb"包括具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中所述片段包含一个V_H结构域与同一多肽链上的V_L结构域相连(V_H-V_L或V_L-V_H) (例如,见Holliger P. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 15;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161)。通过使用太短的连接子,使同一链上的两个结构域之间配对,结构域被迫与另一链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。这些抗原结合位点可以针对相同或不同的抗原(或表位)。在某些实施方案中,"双特异性ds双体抗体"是针对两种不同抗原(或表位)的双体抗体。在某些实施方案中,"scFv二聚体"是一种二价双体抗体或二价ScFv(BsFv),其包含V_H-V_L(由肽接头连接)与另一个V_H-V_L分子二聚化,从而一个部分的V_H与另一个部分的V_L配合并形成两个结合位点,其可针对相同抗原(或表位)或不同抗原(或表位)。在其他实施方案中,"scFv二聚体"是一种双特异性双体抗体,包括与V_{L1}-V_{H2}(由肽接头连接)相缔合的V_{H1}-V_{L2}(由肽接头连接),这样V_{H1}和V_{L1}配合,V_{H2}和V_{L2}配合,每个配合配对具有不同抗原特异性。

"域抗体"是指只包含重链可变区或轻链可变区的抗体片段。在某些情况下,两个或更多的V_H结构域与肽接头共价连接,形成一个二价或多价结构域抗体。一个二价域抗体的两个V_H域可以针对相同或不同的抗原。

本文所用的术语"嵌合"是指一种抗体或抗原结合片段,其重链和/或轻链的一部分来自一个物种,重链和/或轻链的其余部分来自另一个物种。在一个说明性的例子中,一个嵌合抗体可以包含来自人的恒定区,和来自非人动物的可变区,如来自小鼠或大鼠。在一些实施方案中,非人动物是哺乳动物,例如,小鼠、大鼠、兔子、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠。

本文所用的术语"人源化"是指该抗体或抗原结合片段包含来自非人动物的CDR,来自人的FR区域,以及在适用时,来自人的恒定区。

如本文所用，术语"MASP-2"是指与甘露聚糖结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶2，它是补体系统MBL途径中的一个重要成员。人、小鼠和食蟹猴MASP-2的氨基酸和核酸序列可以在公共数据库诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot中找到。如本文所用，术语MASP-2包括包含突变的蛋白质，例如，全长野生型MASP-2的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。在某些实施方案中，人MASP-2蛋白包含SEQ ID NO: 39的氨基酸序列。在某些实施方案中，小鼠MASP-2蛋白包含SEQ ID NO: 40的氨基酸序列。在某些实施方案中，食蟹猴MASP-2蛋白包含SEQ ID NO: 43的氨基酸序列。在某些实施方案中，合成了包括小鼠MASP-2 CUB1-EGF-CUB2结构域(残基20-297)和人MASP-2 CCP1-CCP2-SP结构域(残基298-686)的嵌合MASP-2蛋白，其氨基酸序列为SEQ ID NO: 42。

本文所用的术语"特异性结合"或"特异地结合"是指两个分子之间的非随机性结合反应，诸如在抗体和抗原之间。在某些实施方案中，本文提供的抗体或抗原结合片段与人MASP-2特异地结合，其结合亲和力(K_D)为 $\leq 10^{-6}$ M (例如 $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, $\leq 5 \times 10^{-10}$ M, $\leq 2 \times 10^{-10}$ M, $\leq 10^{-10}$ M, $\leq 5 \times 10^{-11}$ M, $\leq 2 \times 10^{-11}$ M, $\leq 10^{-11}$ M, $\leq 5 \times 10^{-12}$ M, $\leq 4 \times 10^{-12}$ M, $\leq 3 \times 10^{-12}$ M, $\leq 2 \times 10^{-12}$ M, or $\leq 10^{-12}$ M。此处使用的 K_D 是指解离速率与缔合速率的比值(k_{off}/k_{on})，可通过使用本领域已知的任何常规方法确定，包括但不限于表面等离子体共振法、微尺度热泳法、HPLC-MS法、生物层干涉法和流式细胞仪(如FACS)法。在某些实施方案中， K_D 值可以通过使用ForteBio方法适当地确定。

本文所用的"阻断结合"或"竞争同一表位"的能力是指抗体或抗原结合片段对两个分子(例如，MASP-2蛋白和抗MASP-2抗体)之间的结合作用的抑制达到任何可检测的程度。在某些实施方案中，阻断两个分子之间结合的抗体或抗原结合片段对两个分子之间的结合作用的抑制程度为至少50%，至少60%，至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，或至少90%。在某些实施方案中，这种抑制可以大于60%，大于70%，大于75%，大于80%，大于85%，或大于90%。

本文所用的术语"表位"是指抗体所结合的抗原上的特定原子或氨基酸组。如果两个抗体表现出对抗原的竞争性结合，则它们可能结合相同或紧密相关的抗原表位。例如，如果一个抗体或抗原结合片段阻止参考抗体与抗原(如人/猴MASP-2)的结合至少50%，至少60%，至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，或至少90%，那么该抗体或抗原结合片段可被认为与参考抗体结合相同/紧密相关的表位。

本领域的技术人员将认识到，无需进行不必要的实验就可能确定一种人单克隆抗体是否与本发明的抗体结合同一表位，只要通过弄清前者是否阻止后者与MASP-2抗原多肽的结合。如果测试抗体与本发明的抗体竞争，如同表现为本发明的抗体与MASP-2抗原多肽的结合减少，那么这两种抗体结合到相同或紧密相关的表位。或者，如果测试抗体与MASP-2抗原多肽的结合被本发明的抗体所抑制，那么这两种抗体与相同或紧密相关的表位结合。

本文中所述的术语"OMS721"是指Omeros公司的单抗Narsoplimab (OMS721)，其完整结构记载于美国专利US9011860B2中，在中国专利申请号CN201780051640.7中公开了OMS721抗体制剂，所述专利通过引用以其全文并入本文。OMS721具有人IgG4的恒定区。OMS721的重链序

列如SEQ ID NO: 32所示, 轻链序列如SEQ ID NO: 33所示。

OMS721的重链 (hIgG4 kappa) (SEQ ID NO: 32) :

QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSY
RTSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARIRRGIDYWGQGLVTVSSASTKGP
SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSLGK

OMS721的轻链 (hIgG4 kappa) (SEQ ID NO: 33) :

QPVLTQPPSLVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVVMYQDKQRPSGIPERFS
GSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLRVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

关于氨基酸序列的"保守取代"是指将一个氨基酸残基用具有类似理化性质的侧链的不同氨基酸残基来替代。例如, 可以在具有疏水侧链的氨基酸残基(如Met、Ala、Val、Leu和Ile)之间, 在具有中性亲水侧链的残基(如Cys、Ser、Thr、Asn和Gln)之间, 具有酸性侧链的残基(如Asp、Glu), 具有碱性侧链的氨基酸(如His、Lys和Arg), 或具有芳香族侧链的残基(如Trp、Tyr和Phe)之间进行保守取代。如本领域所知, 保守取代通常不会引起蛋白质构象结构的显著变化, 因此可以保留蛋白质的生物活性。

本文所用的术语"同源物"和"同源的"是可以互换的, 指的是在最适比对时, 与另一序列具有至少80%(例如, 至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)的核酸序列(或它的互补链)或氨基酸序列。

关于氨基酸序列(或核酸序列)的"序列同一性百分比(%)"是指在比对序列并在必要时引入空位以达到相同氨基酸(或核酸)的最大数量后, 候选序列中与参考序列中的氨基酸(或核酸)残基相同的氨基酸(或核酸)残基的百分比。氨基酸残基的保守取代可以被也可以不被视为相同的残基。为了确定氨基酸(或核酸)序列同一性的百分比, 可以使用公开的工具, 例如BLASTN、BLASTp(可在美国国家生物技术信息中心(NCBI)的网站上找到, 另见Altschul S.F. et al, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Stephen F. et al, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)), ClustalW2(可在欧洲生物信息学研究所的网站上找到, 另见Higgins D.G. et al, *Methods in Enzymology*, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21): 2947-8 (2007)), 以及ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件来实现比对。本领域的技术人员可以使用该工具提供的默认参数, 也可以根据比对的情况定制参数, 例如, 通过选择合适的算法。

本文所用的"治疗"或"处理"病症包括预防或缓解一种病症, 减缓一种病症的发病或发展速度, 减少一种疾病的风险, 预防或推迟与一种病症相关的症状的发展, 减少或结束与一种疾病相关的症状, 产生一种病症的完全或部分消退, 治愈一种病症, 或其一些组合。

一种“分离的”物质已经被人力从其自然状态中改变了。如果一种“分离的”成分或物质出现在自然界中，那么它已经被改变或从其原来的环境中移除，或者两种情况都是。例如，自然存在于活体动物中的多核苷酸或多肽不是“分离的”，但如果同一多核苷酸或多肽已经与自然状态下的共存物质充分分开，从而以基本纯净的状态存在，则是“分离的”。分离的“核酸”或“多核苷酸”可互换使用，指的是分离的核酸分子的序列。在某些实施方案中，“分离的抗体或其抗原结合片段”是指抗体或抗原结合片段的纯度至少为60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，如通过电泳方法（如SDS-PAGE、等电聚焦、毛细管电泳）或色谱方法（如离子交换色谱或反相HPLC）所确定的。

本文所用的术语“载体”是指一种载体，编码蛋白质的多核苷酸可以可操作地插入其中，以实现该蛋白质的表达。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞，以使其携带的遗传元件在宿主细胞内得到表达。载体的实例包括质粒、噬菌体、粘粒、人工染色体，如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC)，噬菌体，如 λ 噬菌体或M13噬菌体，以及动物病毒。用作载体的动物病毒类别包括逆转录病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳头多瘤空泡病毒（如SV40）。载体可以包含各种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、可选择元件和报告基因。此外，载体还可以包含一个复制起点。载体还可以包含帮助其进入细胞的材料，包括但不限于病毒颗粒、脂质体或蛋白质包衣。载体可以是表达载体或克隆载体。本发明提供的载体（例如表达载体）含有本文提供的编码抗体或其抗原结合片段的核酸序列、至少一个与核酸序列可操作连接的启动子（例如SV40、CMV、EF-1 α ）以及至少一个选择标记。载体的实例包括但不限于逆转录病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如SV40）、 λ 噬菌体和M13噬菌体，质粒pcDNA3.3、pMD18-T、pOptivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos等等。

本文所用的“宿主细胞”是指引入了外源性多核苷酸和/或载体的细胞。

补体系统与许多急性和慢性疾病或病症的发病机制有关，包括：心肌梗塞、卒中、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、再灌注损伤、败血症休克、热烧伤后的毛细血管渗漏、心肺旁路术后炎症、移植排斥、类风湿性关节炎、多发性硬化症、重症肌无力症和阿尔茨海默病。在几乎所有这些疾病或病症中，补体不是病因，但是是参与发病机制的几个因素之一。补体激活可能是一个主要的病理机制，代表了许多这些疾病状态中临床控制的有效点。MASP-2参与MBL途径，即三大补体激活途径之一，也可能参与许多疾病或状态的发病机制。在一些实施方案中，与MASP-2依赖性补体激活有关的疾病或病症是自身免疫性疾病、血管病症、缺血再灌注损伤、动脉硬化、

炎症、肺部病症、体外再灌注手术、肌肉骨骼病症、肾脏病症、皮肤病症、器官或组织移植手术、神经系统疾病或损伤、血液疾病、泌尿生殖系统病症、非肥胖型糖尿病或与1型或2型糖尿病相关的并发症、癌症、内分泌疾病或眼科病症。

本文所用的术语“甘露聚糖结合凝集素” (“MBL”) 等同于甘露聚糖结合蛋白 (“MBP”)。术语“膜攻击复合物” (“MAC”, 也被称为C5b-9) 是指由五种终末补体成分 (C5-C9) 组成的复合物, 它插入并破坏细胞膜。

本文所用的术语“自身免疫性疾病”是指一种病理生理状态, 其中免疫反应是针对人体自身组织的, 并对其造成损害 (自身免疫性)。自身免疫性疾病的实例, 包括但不限于血栓性微血管病 (TMA)、非典型溶血性尿毒症 (aHUS)、造血移植相关的热性微血管病 (TA-TMA)、狼疮肾炎、系统性红斑狼疮 (SLE) 和IgA肾病。

本文所用的术语“肿瘤”是指是指机体在各种致癌因子作用下, 局部组织细胞增生所形成的新生物。

术语“药学上可接受的”表示指定的载体、稀释剂、赋形剂和/或盐通常与构成制剂的其他成分在化学上和/或物理上相容, 并与接受者在生理上相容。

药物制剂

如本文所使用, 术语“药物制剂”意指至少一种活性成分 (例如特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段) 与至少一种非活性成分的组合, 所述非活性成分在与活性成分和/或一种或多种额外非活性成分组合时适用于治疗性施用至人类或非人类动物。除非另外具体说明, 否则如本文所使用的术语“制剂”意指“药物制剂”。本发明提供包含至少一种治疗性抗体的药物制剂。根据本发明的某些实施方案, 治疗性抗体为特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段。更具体地, 本发明包括药物制剂, 其包含: (i) 特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段; (ii) 包含组氨酸和/或醋酸缓冲体系的缓冲液; (iii) 包含聚山梨酯的表面活性剂; 和 (iv) 包含蔗糖、海藻糖和/或脯氨酸的辅料。如果额外组分不会显著地干扰制剂的稳定性, 则所述组分可包括于本发明的制剂中。下文详细描述本发明内所包括的具体示例性组分和制剂。

在某些实施例中, 本发明的药物制剂为液体制剂。如本文所使用, 表述“液体制剂”意指在约 2°C 至约 40°C 下主要以液体状态存在的至少两种组分的混合物。液体制剂可视其特定成分而具有低粘度、中等粘度或高粘度。

如本文所用, 术语“缓冲液”是指弱酸及其共轭碱或弱碱及其共轭酸的混合物。例如, 如本文所用, “醋酸缓冲液”是指包含醋酸钠以及其共轭酸醋酸的混合物。由于在弱酸与其共轭碱之间建立了化学平衡, 当向溶液中加入少量酸或碱时, 含有缓冲液的溶液抵抗 pH 值的突然变化。

如本文所用, 术语“质量渗透压摩尔浓度”是指溶解的溶质颗粒在水溶液中的渗透压的度量。溶质颗粒包括两种离子以及非离子化分子。渗透压表示为溶解在 1kg 溶剂 (即水) 中的渗透活性颗粒的浓度 (即渗透压摩尔)。本文以毫渗透压摩尔/千克水 (mOsm/kg) 为单位表示质量渗透

压摩尔浓度。

本文中术语“辅料”意指添加至制剂中以提供期望稠度、粘度和/或稳定作用的任何非治疗剂，本发明优选的辅料包括但不限于海藻糖、蔗糖、和脯氨酸。

“粒径(Diameter)”和“平均粒径(Mean Diameter)”是指微粒制剂对应的强度体积径，可以采用动态光散射仪例如激光粒度仪测得。

本发明的抗体

本发明的药物制剂内所含有的抗体或其抗原结合片段的量可视制剂所期望的具体特性以及意图使用制剂的特定情况和目的而变化。在某些实施例中，药物制剂可含有约 0.1 mg/mL 至约 500 mg/mL 的抗体；约 0.5 mg/mL 至约 400 mg/mL 的抗体；约 1 mg/mL 至约 200 mg/mL 的抗体；约 2 mg/mL 至约 100 mg/mL；约 1 mg/mL 至约 5 mg/mL 的抗体；约 10 mg/mL 至约 30 mg/mL 的抗体；约 75 mg/mL 至约 125 mg/mL；约 5 mg/mL 至约 50 mg/mL；或约 2 mg/mL 至约 150 mg/mL 的抗体。举例来说，本发明的制剂可为液体制剂，其包含约 0.5 mg/mL；约 1 mg/mL；约 2 mg/mL；约 3 mg/mL；约 4 mg/mL；约 5 mg/mL；约 6 mg/mL；约 7 mg/mL；约 8 mg/mL；约 9 mg/mL；约 10 mg/mL；约 11 mg/mL；约 12 mg/mL；约 13 mg/mL；约 14 mg/mL；约 15 mg/mL；约 16 mg/mL；约 17 mg/mL；约 18 mg/mL；约 19 mg/mL；约 20 mg/mL；约 21 mg/mL；约 22 mg/mL；约 23 mg/mL；约 24 mg/mL；约 25 mg/mL；约 26 mg/mL；约 27 mg/mL；约 28 mg/mL；约 29 mg/mL；约 30 mg/mL；约 35 mg/mL；约 40 mg/mL；约 45 mg/mL；约 50 mg/mL；约 55 mg/mL；约 60 mg/mL；约 65 mg/mL；约 70 mg/mL；约 75 mg/mL；约 80 mg/mL；约 85 mg/mL；约 90 mg/mL；约 95 mg/mL；约 96 mg/mL；约 97 mg/mL；约 98 mg/mL；约 99 mg/mL；约 100 mg/mL；约 101 mg/mL；约 102 mg/mL；约 103 mg/mL；约 104 mg/mL；约 105 mg/mL；约 110 mg/mL；约 115 mg/mL；约 120 mg/mL；约 125 mg/mL；约 130 mg/mL；约 135 mg/mL；约 140 mg/mL；约 145 mg/mL；约 150 mg/mL；约 155 mg/mL；约 160 mg/mL；约 165 mg/mL；约 170 mg/mL；约 175 mg/mL；约 180 mg/mL；约 185 mg/mL；约 190 mg/mL；约 195 mg/mL；或约 200 mg/mL 的特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中，药物制剂为液体制剂，其可含有 1 ± 0.1 mg/mL 至 200 ± 20 mg/mL 的抗体； 2 ± 0.2 mg/mL 至 100 ± 10 mg/mL 的抗体； 1 ± 0.5 mg/mL 至 30 ± 5 mg/mL 的抗体； 10 ± 1 mg/mL 至 30 ± 3 mg/mL 的抗体； 1 ± 0.1 mg/mL 至 3 ± 0.3 mg/mL 的抗体； 15 ± 1.5 mg/mL 至 25 ± 2.5 mg/mL 的抗体； 90 ± 5 mg/mL 至 110 ± 5 mg/mL 的抗体；或 150 ± 7.5 mg/mL 至 170 ± 7.5 mg/mL 的抗体。在一些实施方案中，药物制剂含有 20 ± 2 mg/mL 的抗体。在一些实施方案中，药物制剂含有 60 ± 6 mg/mL 的抗体。在一些实施方案中，药物制剂含有 100 ± 10 mg/ml 的抗体。在一些实施方案中，药物制剂含有 150 ± 15 mg/ml 的抗体。

生物等效物 11

本发明涵盖具有与本文所公开的示例性分子的氨基酸序列不同的氨基酸序列但保留人 MASP-2 特异性结合能力的抗体或其抗原结合片段。当相比于亲本序列时，此类变异分子可包含氨基酸的一个或多个添加、缺失或取代，但仍展现与本文所论述的抗体的生物活性基本上等

效的生物活性。

本发明包括与本文所阐述的示例性抗体中的任一者生物等效的抗原结合分子。举例来说，如果两种抗体为当在类似实验条件下以相同剂量（单次剂量或多次剂量）施用，吸收速率和吸收程度未显示显著差异的医药等效物或医药替代物，则将其视为生物等效的。如果一些抗体在其吸收程度方面等效但在其吸收速率方面并不等效，则将其视为等效物或医药替代物，且仍可将其视为生物等效的，这是因为此类吸收速率方面的差异为既定的且反映在标签中，对于在例如长期使用达到有效体内药物浓度并非必需的，且对于所研究的特定药品在医疗上无关紧要。

在一个实施例中，如果两种抗体的安全性、纯度和效力不存在临床上有意义的差异，则所述两种抗体是生物等效的。

在一个实施例中，如果患者可以在参考产品与生物学产品之间转换一或多次且相比于不具有所述转换的持续疗法，预期副作用风险没有增加，则两种抗体为生物等效的，所述副作用包括临床上显著的免疫原性变化或经减弱的有效性。

生物等效性可通过体内和体外方法证明。生物等效性测量包括例如（a）人类或其它哺乳动物中的体内测试，其中测量血液、血浆、血清或其它生物流体中的抗体或其代谢物随时间变化的浓度；（b）与人类体内生物可用性资料相关且合理地预测人类体内生物可用性资料的体外测试；（c）人类或其它哺乳动物中的体内测试，其中测量抗体（或其目标）随时间变化的适当急性药理学作用；和（d）建立抗原结合蛋白的安全性、功效或生物可用性或生物等效性的良好受控的临床试验。

制剂辅料和 pH

本发明的药物制剂包含一种或多种辅料。如本文所使用，术语“辅料”意指添加至制剂中以提供期望稠度、粘度和/或稳定作用的任何非治疗剂。

在某些实施例中，本发明的药物配药物制剂具有小于 30 cP 的粘度，这有利于从预填充注射器或自动注射器递送组合物。在一些实施方案中，本发明的稳定的液体制剂具有约 1.0 cP-30cP 的粘度。在一些情况下，当使用动态光散射仪（DLS）测量时，药物制剂在 25℃ 下的粘度为小于 28 cP、小于 25 cP、小于 23 cP、小于 20 cP、小于 18 cP、小于 15 cP、小于 13 cP、小于 10 cP、小于 7 cP 或小于 5 cP，例如约 1.0 cP- 10cP。在一个实施方案中，所述液体制剂在 25℃ 的粘度为约 1.0 cP- 20cP。在一些实施方案中，当使用 DLS 测量时，药物制剂在 25℃ 下在至多 150 mg/ml 的抗体浓度下的粘度为小于 15 cP。在一个实施方案中，所述液体制剂在 25℃ 的粘度为约 1.0 cP- 10cP。在一个实施方案中，所述液体制剂在 25℃ 的粘度为约 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 或 10.0cP。在一些实施方案中，当使用 DLS 测量时，药物制剂在 25℃ 下在至多 150 mg/ml 的抗体浓度下的粘度为小于 7 cP。在一个实施方案中，所述液体制剂在 4-40℃ 的粘度为约 5.0 cP-7.0cP。在一个实施方案中，所述液体制剂在 4-40℃ 的粘度为约 6.8cP。在一个实施方案中，所述液体制剂在 25℃ 的粘度为约 6.8cP。

本发明的药物制剂内所含有的辅料的量视使用制剂的具体情况和预期目的而变化。在某些

实施例中，制剂可含有约 0.1%至约 20%辅料；约 0.5%至约 20%辅料；约 1%至约 20%辅料；约 2%至约 15%辅料；约 5%至约 15%辅料；约 7.5%至约 12.5%辅料；或约 9%至约 11%辅料。举例而言，本发明的药物制剂可包含约 0.5%、约 1.0%、约 1.5%、约 2.0%、约 2.5%、约 3.0%、约 3.5%、约 4.0%、约 4.5%、约 5.0%、约 5.5%、约 6.0%、约 6.5%、约 7.0%、约 7.5%、约 8.0%、约 8.5%、约 9.0%、约 9.5%、约 10.0%、约 10.5%、约 11.0%、约 11.5%、约 12.0%、约 12.5%、约 13.0%、约 13.5%、约 14.0%、约 14.5%、约 15%或约 20%辅料（例如蔗糖）。在一些实施方案中，制剂含有约 $5.8\% \pm 0.5\%$ 辅料（例如蔗糖）。在一些实施方案中，制剂含有约 $6.0\% \pm 0.5\%$ 辅料（例如蔗糖）。在一些实施方案中，制剂含有约 $6.5\% \pm 0.5\%$ 辅料（例如蔗糖）。在一些实施方案中，制剂含有约 $7.0\% \pm 0.5\%$ 辅料（例如蔗糖）。在一些实施方案中，制剂含有约 $8.6\% \pm 0.5\%$ 辅料（例如蔗糖）。上述百分比中的每一者对应于重量/体积百分比（w/v）。在一些情况下，制剂含有 $5.5\% \pm 0.5\%$ 至 $9\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖。在一些情况下，制剂含有 $5.5\% \pm 0.5\%$ 至 $9\% \pm 0.5\%$ (w/v) 海藻糖。在一些情况下，制剂含有 200mM 至 300mM 脯氨酸。

制剂中的表面活性剂

本发明的药物制剂还可包含一种或多种表面活性剂，其类型和量应在如回转式振荡的粗糙处置或搅动条件下特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段稳定。如本文所使用，术语“表面活性剂”意指降低物质所溶解的流体的表面张力和/或降低油与水之间的界面张力的物质。表面活性剂可以是离子或非离子的。可包括于本发明的制剂中的示例性非离子表面活性剂包括例如烷基聚(环氧乙烷)、烷基多葡萄糖苷（例如辛基葡萄糖苷和癸基麦芽糖苷）、如鲸蜡醇和油醇的脂肪醇、椰油酰胺 MEA、椰油酰胺 DEA 和椰油酰胺 TEA。可包括于本发明的制剂中的具体非离子表面活性剂包括例如聚山梨酯，如聚山梨酯 20、聚山梨酯 28、聚山梨酯 40、聚山梨酯 60、聚山梨酯 65、聚山梨酯 80、聚山梨酯 81 和聚山梨酯 85；泊洛沙姆（poloxamer），如泊洛沙姆 188（也称为 Pluronic F68）、泊洛沙姆 407；聚乙烯-聚丙二醇；或聚乙二醇（PEG）。聚山梨酯 20 也称为 TWEEN 20、脱水山梨糖醇单月桂酸酯和聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯。在一些实施方案中，表面活性剂为聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20，优选聚山梨酯 80。

本发明的药物制剂内所含有的表面活性剂的量可视制剂所期望的具体特性以及意图使用制剂的特定情况和目的而变化。在某些实施例中，制剂可含有约 0.01%至约 1%表面活性剂；约 0.01%至约 0.5%表面活性剂；约 0.05%至约 0.15%；约 0.08%至约 0.12%；或约 0.09%至约 0.11% 表面活性剂。举例来说，本发明的制剂可包含约 0.01%；约 0.02%；约 0.03%；约 0.04%；约 0.05%；约 0.06%；约 0.07%；约 0.08%；约 0.09%；约 0.10%；约 0.11%；约 0.12%；约 0.13%；约 0.14%；约 0.15%；约 0.16%；约 0.17%；约 0.18%；约 0.19%；约 0.20%；约 0.21%；约 0.22%；约 0.23%；约 0.24%；约 0.25%；约 0.26%；约 0.27%；约 0.28%；约 0.29%；或约 0.30% 表面活性剂（例如聚山梨酯 80）。在一些实施方案中，制剂含有约 0.1% 表面活性剂（例如聚山梨酯 80）。上述百分比中的每一者对应于重量/体积百分比（w/v）。在一些情况下，制剂含有 $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ w/v 聚山梨酯 80。在一些情况下，制剂含有 $0.05\% \pm 0.01\%$ w/v 聚山梨酯 80。

制剂的缓冲体系和 pH

本发明的药物制剂还可包含用于维持稳定 pH 且用于帮助稳定特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段的缓冲液或缓冲液系统。在一些实施方案中，缓冲液或缓冲液系统包含缓冲范围完全或部分覆盖 pH 4.7 至 6.1 的范围的至少一种缓冲液。在某些实施例中，缓冲液包含组氨酸缓冲液和/或醋酸缓冲液。在某些实施例中，缓冲液（例如组氨酸）以约 1 mM 至约 40 mM、约 1 mM 至约 30 mM、约 1 mM 至约 20 mM；约 3 mM 至约 18 mM、约 5 mM 至约 15 mM；或约 8 mM 至约 12 mM 的浓度存在。在一些实施方案中，缓冲液（例如组氨酸）以约 1 mM；约 2 mM；约 3 mM；约 4 mM；约 5 mM；约 6 mM；约 7 mM；约 8 mM；约 9 mM；约 10 mM；约 11 mM；约 12 mM；约 13 mM；约 14 mM；约 15 mM；约 16 mM；约 17 mM；约 18 mM；约 19 mM；或约 20 mM 的浓度存在。在一些情况下，制剂含有浓度为 $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 至 $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ 的组氨酸缓冲液。在一些情况下，制剂含有浓度为 $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ 的组氨酸缓冲液。在一些实施方案中，组氨酸缓冲液包含 L-组氨酸和一水合 L-组氨酸盐酸盐。在一些情况下，组氨酸缓冲液包含浓度为 0.175 mg/mL 的 L-组氨酸和浓度为 1.86 mg/mL 的一水合 L-组氨酸盐酸盐。

在一些实施方案中，制剂含有醋酸缓冲液。在一些实施方案中，缓冲液（例如醋酸）以约 1 mM 至约 40 mM、约 1 mM 至约 30 mM、约 1 mM 至约 20 mM；约 3 mM 至约 18 mM、约 5 mM 至约 15 mM；或约 8 mM 至约 12 mM 的浓度存在。在一些实施方案中，缓冲液（例如醋酸）以约 1 mM；约 2 mM；约 3 mM；约 4 mM；约 5 mM；约 6 mM；约 7 mM；约 8 mM；约 9 mM；约 10 mM；约 11 mM；约 12 mM；约 13 mM；约 14 mM；约 15 mM；约 16 mM；约 17 mM；约 18 mM；约 19 mM；或约 20 mM 的浓度存在。在一些情况下，制剂含有浓度为 $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 至 $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ 的醋酸缓冲液。在一些情况下，制剂含有浓度为 $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ 的醋酸缓冲液。在一些实施方案中，醋酸缓冲液包含醋酸和三水合醋酸钠。在一些情况下，组氨酸缓冲液包含浓度为 10 mM 的组氨酸盐。

在抗体纯化过程中，可能期望或有必要将一种缓冲液交换为另一种，以达成合适的赋形剂浓度、抗体浓度、pH 等。可以例如通过使用例如半透切向流过滤膜的超过滤/透滤作用 (UF/DF) 来完成缓冲液交换。然而，使用此类技术有可能引起吉布斯-唐南效应 (Gibbs-Donnan effect) (Bolton 等人, 2011, 《生物技术进展 (Biotechnol. Prog.)》 27 (1):140-152)。在蛋白质浓缩过程中，膜的产品侧上正电荷的积累通过正离子优先向膜的对侧移动而在电学上得到配衡。此现象的潜在后果是，由于在 UF/DF 步骤期间带正电荷的透滤缓冲赋形剂对带正电荷的抗体蛋白的静电排斥，因此某些组分（例如组氨酸）的最终浓度可能低于这些组分的预期目标浓度。因此，本发明包括以下制剂，其中由于吉布斯-唐南效应，例如组氨酸/醋酸的浓度在本文所叙述的量或范围内变化。

体积排阻描述了高浓度样品的特性，其中溶液总体积中的很大一部分被溶质占据，尤其是大分子（如蛋白质），使溶剂排除在此空间之外。随后，此减少了可用于溶解其它溶质的溶剂的总体积，其可能会导致超过滤膜分配不均。因此，本发明包括制剂，其中由于体积排阻效应，例如组氨酸的浓度可在本文所叙述的量或范围内变化。

在制造本发明制剂期间，制剂的组成可能发生变化。这些变化可包括活性成分的浓度、赋形剂的浓度和/或制剂的 pH。本发明包括包含特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段的制剂，所述特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段是稳定的且在赋形剂浓度变化高达至少 10% 的情况下保留效力。举例来说，本文包括特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段制剂，其中所述制剂的稳定性和效力不受抗体、辅料、缓冲液和/或表面活性剂的浓度的 $\pm 10\%$ 或 $\pm 20\%$ 变化影响。

药物制剂的稳定性

本发明的药物制剂展现高水准的稳定性。如本文所使用的关于药物制剂的术语“稳定”意指药物制剂内的抗体在储存限定时间量之后保留可接受程度的结构和/或功能和/或生物活性。即使制剂中所含有的抗体在储存限定时间量之后无法维持 100% 的其结构和/或功能和/或生物活性，所述制剂仍可为稳定的。在某些情况下，约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% 的抗体在储存限定时间量之后的结构和/或功能和/或生物活性的维持可视为“稳定的”。

在一些实施方案中，本发明的稳定的液体制剂具有 2-10 μm 的平均粒径，如通过微流成像系统 (MFI) 所测定的。

在一些实施方案中，本发明的稳定的液体制剂具有 250~350 mOsm/kg H_2O 之间的质量渗透压摩尔浓度。

在一些实施方案中，稳定性可尤其通过测定在给定温度下储存限定时间量之后制剂中抗体的蛋白含量（浓度）来测量。当本文使用“可接受的稳定度”时，所述短语意指可在给定温度下储存限定时间量之后在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过 10%。在某些实施例，可在给定温度下储存限定时间量之后在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少。测量稳定性之前的限定时间量可为至少 3 天、至少 5 天、至少 1 周、至少 10 天、至少 2 周、至少 3 周、至少 4 周、至少 5 周、至少 6 周、至少 3 个月、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 7 个月、至少 8 个月、至少 9 个月、至少 10 个月、至少 11 个月、至少 12 个月、至少 24 个月、至少 36 个月或更长时间。当评定稳定性时药物制剂可储存的温度可为约 -80°C 至约 45°C 的任何温度，例如储存在约 -80°C 、约 -30°C 、约 -20°C 、约 0°C 、约 4°C - 8°C 、约 5°C 、约 25°C 、约 35°C 、约 37°C 、约 40°C 或约 45°C 下。举例来说，如果在 4°C 下储存 3 个月后，在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少，则药物制剂可视为稳定的。如果在 4°C 下储存 6 个月后，在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少，则药物制剂也可视为稳定的。如果在 4°C 下储存 9 个月后，在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少，则药物制剂也可视为稳定的。如果在 4°C 下储存 12 个月后，在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少，则药物制剂也可视为稳定的。如果在 4°C 下储存 24 个月后，在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更少，则药物制剂也可视为稳定的。如果在 4°C 下储存 36 个月

后,在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少,则药物制剂也可视为稳定的。如果在25℃下储存2周后,在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少,则药物制剂也可视为稳定的。如果在25℃下储存1个月后,在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少,则药物制剂也可视为稳定的。如果在25℃下储存4周后,在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少,则药物制剂也可视为稳定的。如果在25℃下储存6周后,在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少,则药物制剂也可视为稳定的。如果在40℃下储存2周后,在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少,则药物制剂也可视为稳定的。如果在40℃下储存4周后,在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少,则药物制剂也可视为稳定的。如果在40℃下储存6周后,在制剂中检测到抗体的蛋白含量变化不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少,则药物制剂也可视为稳定的。

在一些实施方案中,稳定性可尤其通过测定在给定温度下储存限定时间量之后制剂中抗体的单体纯度百分比来测量。抗体的单体纯度尤其可以通过尺寸排阻色谱法(例如尺寸排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC))来测定。当本文使用“可接受的稳定度”时,所述短语意指可在给定温度下储存限定时间量之后在制剂中检测到抗体的单体纯度至少90%。在某些实施例中,可在给定温度下储存限定时间量之后在制剂中检测到抗体的单体纯度至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。测量稳定性之前的限定时间量可为至少3天、至少5天、至少1周、至少10天、至少2周、至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少24个月、至少36个月或更长时间。当评定稳定性时药物制剂可储存的温度可为约-80℃至约45℃的任何温度,例如储存在约-80℃、约-30℃、约-20℃、约0℃、约4℃-8℃、约5℃、约25℃、约35℃、约37℃、约40℃或约45℃下。举例来说,如果在4℃下储存3个月后,通过SEC-HPLC检测到抗体的单体纯度大于约90%、95%、96%或97%,则药物制剂可视为稳定的。如果在4℃下储存6个月后,通过SEC-HPLC检测到抗体的单体纯度大于约90%、95%、96%或97%,则药物制剂也可视为稳定的。如果在4℃下储存9个月后,通过SEC-HPLC检测到抗体的单体纯度大于约90%、95%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%或99.5%,则药物制剂也可视为稳定的。如果在4℃下储存12个月后,通过SEC-HPLC检测到抗体的单体纯度大于约90%、95%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%或99.5%,则药物制剂也可视为稳定的。如果在4℃下储存24个月后,通过SEC-HPLC检测到抗体的单体纯度大于约90%、95%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%或99.5%,则药物制剂也可视为稳定的。如果在4℃下储存36个月后,通过SEC-HPLC检测到抗体的单体纯度大于约90%、95%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%或99.5%。

则药物制剂也可视为稳定的。如果在 25℃ 下储存 2 周后, 通过 SEC-HPLC 检测到抗体的单体纯度大于约 90%、95%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99% 或 99.5%, 则药物制剂也可视为稳定的。如果在 25℃ 下储存 1 个月后, 通过 SEC-HPLC 检测到抗体的单体纯度大于约 90%、95%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99% 或 99.5%, 则药物制剂也可视为稳定的。如果在 25℃ 下储存 4 周后, 通过 SEC-HPLC 检测到抗体的单体纯度大于约 90%、95%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99% 或 99.5%, 则药物制剂也可视为稳定的。如果在 25℃ 下储存 6 周后, 通过 SEC-HPLC 检测到抗体的单体纯度大于约 90%、95%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99% 或 99.5%, 则药物制剂也可视为稳定的。如果在 40℃ 下储存 2 周后, 通过 SEC-HPLC 检测到抗体的单体纯度大于约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97% 或 98%, 则药物制剂也可视为稳定的。如果在 40℃ 下储存 4 周后, 通过 SEC-HPLC 检测到抗体的单体纯度大于约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97% 或 98%, 则药物制剂也可视为稳定的。如果在 40℃ 下储存 6 周后, 通过 SEC-HPLC 检测到抗体的单体纯度大于约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97% 或 98%, 则药物制剂也可视为稳定的。

在其他的实施方案中, 使用其它方法以评定本发明的制剂的稳定性, 如用以测定溶液混浊度的在约 405 nm 或约 350 nm 处的吸光度、用以测定热稳定性的差示扫描热量测定 (DSC) 和用以测定机械稳定性的受控搅动。举例来说, 如果在约 4℃ 至约 25℃ 下储存 6 周或更长一段时间后, 本发明的制剂的 OD405 相对于 t=0 时制剂的 OD405 的变化小于约 0.05 (例如 0.04、0.03、0.02、0.01 或更小), 则制剂可视为稳定的。

在一些实施方案中, 可以通过检测制剂的外观、可见异物, 来指示储存后制剂的稳定性。在一个具体的实施方案中, 在储存后, 通过目视检查本发明液体制剂的稳定性, 其中本发明液体制剂在外观上保持为澄清至微乳光, 为无色至淡黄色液体, 且无异物。在一个实施方案中, 在澄明度检测仪下目视检查, 制剂中无可见异物存在。

在其他的实施方案中, 通过测量抗体与其目标的结合亲和力评定稳定性。举例来说, 如果在例如 -80℃、-30℃、-20℃、5℃、25℃、37℃、40℃ 或 45℃ 等温度下储存限定时间量 (例如 7 天至 12 个月、24 个月或 36 个月) 后, 本发明的制剂内所含有的特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段以抗体在所述储存之前的结合亲和力的至少 80%、85%、90%、95% 或更多亲和力结合至人 MASP-2, 则制剂可视为稳定的。结合亲和力可通过如 ELISA 或等离子共振的任何方法来测定。生物活性可通过 MASP-2 活性分析来测定, 例如通过使表达 MASP-2 的细胞与包含特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段的制剂接触。抗体与此类细胞的结合可如经由 FACS 分析来直接测量。

在一些实施方案中, 稳定性可以通过测定在限定条件下储存限定时间量之后在制剂内形成聚集物 (高分子量 (HMW)) 的抗体的百分比来测量, 其中稳定性与所形成的聚集物百分比成反比。经聚集的抗体的百分比可尤其通过尺寸排阻色谱法 (例如尺寸排阻高效液相色谱法 (SEC-HPLC)) 来测定。当本文使用“可接受的稳定度”时, 所述短语意指至多 6% 的抗体呈在给定温度下储存限定时间量之后在制剂中检测到的聚集形式。在某些实施例中, 可接受的稳定度意指可

在给定温度下储存限定时间量之后在制剂中的聚集物中检测到至多约 6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或 0.1%的抗体。测量稳定性之前的限定时间量可为至少 3 天、至少 5 天、至少 1 周、至少 10 天、至少 2 周、至少 3 周、至少 4 周、至少 5 周、至少 6 周或更长时间。当评定稳定性时药物制剂可储存的温度可为约-80℃至约 45℃的任何温度，例如储存在约-80℃、约-30℃、约-20℃、约 0℃、约 4℃-8℃、约 5℃、约 25℃、约 35℃、约 37℃、约 40℃或约 45℃下。举例来说，如果在 40℃下储存 6 周后，检测到小于约 10%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1.75%、1.5%、1.25%、1%、0.75%、0.5%、0.25%或 0.1%呈聚集形式的抗体，则药物制剂可视为稳定的。如果在 25℃度下储存 6 周后，检测到小于约 10%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1.75%、1.5%、1.25%、1%、0.75%、0.5%、0.25%或 0.1%呈聚集形式的抗体，则药物制剂也可视为稳定的。

在一些实施方案中，稳定性可尤其通过测定在离子交换期间在比抗体的主要洗脱份（“主要电荷形式”）更具酸性的洗脱份（“酸性形式”）中迁移的抗体的百分比来测量，其中稳定性与呈酸性形式的抗体的分数成反比。“酸化”抗体的百分比可通过离子交换色谱法（例如阳离子交换高效液相色谱法（CEX-HPLC））或全柱成像毛细管等电聚焦电泳法（icIEF）来测定。当本文使用“可接受的稳定度”时，所述短语意指至多 52%的抗体呈在限定温度下储存限定时间量之后在制剂中检测到的较具酸性形式。在某些实施例中，可接受的稳定度意指可在给定温度下储存限定时间量之后在制剂中检测到至多约 52%、50%、45%、40%、35%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或 0.1%呈酸性形式的抗体。测量稳定性之前的限定时间量可为至少 2 周、至少 28 天、至少 1 个月、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 7 个月、至少 8 个月、至少 9 个月、至少 10 个月、至少 11 个月、至少 12 个月、至少 18 个月、至少 24 个月、至少 30 个月、至少 36 个月或更长时间。当评定稳定性时药物制剂可储存的温度可为约-80℃至约 45℃的任何温度，例如储存在约-80℃、约-30℃、约-20℃、约 0℃、约 4℃-8℃、约 5℃、约 25℃、约 35℃、约 37℃、约 40℃或约 45℃下。举例来说，如果在-80℃、-30℃或-20℃下储存 36 个月后，小于约 29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或 0.1%的抗体呈较具酸性形式，则药物制剂可视为稳定的。如果在 4℃下储存 12 个月、24 个月甚至 36 个月后，小于约 28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或 0.1%的抗体呈较具酸性形式，则药物制剂也可视为稳定的。如果在 25℃下储存 4 周或 6 周后，小于约 30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或 0.1%的抗体呈较具酸性形式，则药物制剂也可视为稳定的。如果在 37℃下储存 4 周或 6 周后，小于约 37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、

4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的抗体呈较具酸性形式，则药物制剂也可视为稳定的。如果在40°C下储存4周或6周后，可检测到小于约52%、51%、50%、49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%呈较具酸性形式的抗体，则药物制剂也可视为稳定的。

在一个实施方案中，通过测定蛋白在升温过程中发生构型变化或聚集而使得粒径发生变化时的转变温度 T_{onset} ，检查本发明液体制剂的稳定性，例如，本发明的液体制剂具有高于约60°C、高于约63°C、高于约65°C、高于约68°C或高于约70°C的 T_{onset} 。

提及“指定时间段之后”药物制剂的稳定性意指在指定时间段结束时或指定时间段快结束时进行稳定性参数测量，且意指对于其后所测量的参数，药物制剂不一定维持相同稳定度。举例来说，提及6周之后的特定稳定性意指在研究开始之后6周时或约6周时进行稳定性测量。用于评定制剂中的抗体的稳定性的额外方法展示于下文所呈现的实例中。

在本发明的一些优选的实施方案中，制剂在振摇后（例如，振摇14天后），按照如上文所述的评估方式是稳定的。

在本发明的一些优选的实施方案中，制剂在搅拌后（例如，搅拌6小时后），按照如上文所述的评估方式是稳定的。

在本发明的一些优选的实施方案中，制剂在光照后（例如，光照3天后），按照如上文所述的评估方式是稳定的。

在本发明的一些优选的实施方案中，制剂在冻融后（例如，经5轮冻融后），按照如上文所述的评估方式是稳定的。

示例性制剂

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含：

- (a) 20 mg/ml \pm 2 mg/ml 至 200 mg/ml \pm 20 mg/ml 抗体，
- (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液，
- (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯，和
- (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖，或 200mM 至 300mM 脯氨酸，pH 为 4.7 至 6.0。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含：

- (a) 20 mg/ml \pm 2 mg/ml 抗体，
- (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液，
- (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯，和
- (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖，pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含：

- (a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体,
 - (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液,
 - (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和
 - (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖,
- pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂包含:

- (a) 100 mg/ml \pm 10 mg/ml 抗体,
 - (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液,
 - (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和
 - (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖,
- pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂包含:

- (a) 150 mg/ml \pm 15 mg/ml 抗体,
 - (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液,
 - (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和
 - (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖,
- pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 20 mg/ml \pm 2 mg/ml 抗体, (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液, (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖, pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 20 mg/ml \pm 2 mg/ml 抗体, (b) 包含 10 mM \pm 2 mM 组氨酸的缓冲液, (c) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (d) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖, pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 20 mg/ml \pm 2 mg/ml 抗体, (b) 0.175 mg/ml L-组氨酸, (c) 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物, (d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (e) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖, pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体, (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液, (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖, pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体, (b) 包含 10 mM \pm 2 mM 组氨酸缓冲体系的缓冲液, (c) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (d) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖, pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中, 药物制剂包含: (a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体, (b) 0.175 mg/ml L-组氨酸, (c) 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物, (d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯, 和 (e) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖, pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中，药物制剂包含：(a) 100 mg/ml \pm 10 mg/ml 抗体，(b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液，(c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯，和 (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖，pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一些实施方案中，药物制剂包含：(a) 100 mg/ml \pm 10 mg/ml 抗体，(b) 包含 10 mM \pm 1 mM 组氨酸缓冲体系的缓冲液，(c) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯，和 (d) 7.0% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖，pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中，药物制剂包含：(a) 100 mg/ml \pm 10 mg/ml 抗体，(b) 0.175 mg/ml L-组氨酸，(c) 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物，(d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯，和 (e) 7.0% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖，pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中，药物制剂包含：(a) 150 mg/ml \pm 15 mg/ml 抗体，(b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液，(c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯，和 (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖，pH 为 5.3 \pm 0.5。

在一些实施方案中，药物制剂包含：(a) 150 mg/ml \pm 15 mg/ml 抗体，(b) 包含 10 mM \pm 1 mM 组氨酸缓冲体系的缓冲液，(c) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯，和 (d) 7.0% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖，pH 为 5.3 \pm 0.1。

在一些实施方案中，药物制剂包含：(a) 150 mg/ml \pm 15 mg/ml 抗体，(b) 0.175 mg/ml L-组氨酸，(c) 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物，(d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨酯，和 (e) 7.0% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖，pH 为 5.3 \pm 0.1。

在这些实施例中的任一者中，聚山梨酯可为聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20，优选聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，所述药物制剂不包含其他缓冲体系/缓冲液。

在一些实施方案中，所述药物制剂不包含其他表面活性剂。

在一些实施方案中，所述药物制剂不包含其他辅料。

本发明的包含抗 MASP-2 抗体或其抗原结合片段的药物制剂处方，可以使所述抗体在较高浓度（例如，约 100 mg/mL，约 150 mg/mL）和低浓度（例如，约 20 mg/mL，约 50 mg/mL）情况下的液体状态时维持较好的稳定性，符合生产工艺的要求和临床应用的需要，可以支持将所述抗体开发为静脉注射液和皮下注射液。

本发明所涵盖的药物制剂的额外非限制性实例在本文其它地方阐述，包括下文所呈现的工作实例。

容器和施用方法

本发明的药物制剂可含于适用于储存药品和其它治疗性组合物的任何容器内。举例来说，药物制剂可含于如小瓶、西林瓶、安瓿、注射器、药筒、瓶或 IV 袋的具有限定体积的经密封且经灭菌的塑料或玻璃容器内。可使用包括例如澄清且不透明（例如琥珀色）玻璃或塑料小瓶的不同类型的小瓶以含有本发明的制剂。同样，可使用任何类型的注射器以含有和/或施用本发明的药物制剂。在一些实施方案中，药物制剂含于预填充注射器中。在一些实施方案中，药物制剂含于预填充立桩针注射器中。

本发明的药物制剂可含于“正常钨”注射器或“低钨”注射器内。如本领域的普通技术人员将了解，制造玻璃注射器的方法一般涉及使用用以刺穿玻璃，由此产生可自其中抽吸液体且自注射器排出的洞的热钨棒。此过程导致痕量钨沉积于注射器的内表面上。后续洗涤和其它处理步骤可用于减少注射器中的钨的量。如本文所使用，术语“正常钨”意指注射器含有大于 500 十亿分率 (ppb) 的钨。术语“低钨”意指注射器含有小于 500 ppb 的钨。举例来说，根据本发明，低钨注射器可含有小于约 490、480、470、460、450、440、430、420、410、390、350、300、250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10 ppb 或更少的钨。

药物制剂可以通过如注射 (例如皮下、静脉内、肌内、腹膜内等) 或经皮、经粘膜、经鼻、经肺和/或经口施用的非经肠途径施用至患者。在一些实施方案中，本发明的药物制剂利用可重复使用的笔式和/或自动注射器式递送装置进行皮下递送。在一些情况下，药物制剂含于特别适于与自动注射器一起使用的注射器中。

本文还考虑使用微输注器来递送本发明的药物制剂。如本文所使用，术语“微输注器”意指皮下递送装置，其经设计以在延长的时间段内 (例如，约 10、15、20、25、30 或更长时间) 缓慢地施用较大体积 (例如，至多约 2.5 mL、约 3.0 mL 或更多) 的治疗性制剂。

在某些实施例中，药物制剂经由 I.V. 滴注施用，使得制剂在含有生理学可接受的溶液的 IV 袋中稀释。在一个实施方案中，药物组合物是处于静脉输液袋中的复合无菌制剂，使得单剂量的药品稀释至 100 mL、250 mL (或其它适合于静脉内滴注递送的类似量) 的生理缓冲液 (例如 0.9% 的盐水)。

本发明的药物制剂还可含于单位剂型中。如本文所使用，术语“单位剂型”是指适用作待治疗的患者的单位剂量的物理离散单位，各单位含有经计算以与所需医药载剂、稀释剂或赋形剂结合产生所期望治疗效果的预定量的活性化合物。在各种实施例中，单位剂型含于如本文所论述的容器内。本发明的制剂中的活性成分 (例如特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段) 的实际剂量水准可变化以便获得可有效达成特定患者、组合物和施用模式所期望的治疗反应且对患者不具有副作用的量的活性成分。所选剂量水准将视各种药物动力学因素而定，所述因素包括所采用的本发明的特定组合物的活性、施用途径、施用时间、所采用的特定化合物的排泄速率、治疗持续时间、与所采用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和/或物种、所治疗患者的年龄、性别、体重、病况、一般健康状况和先前病史；和医学领域中熟知的类似因素。如本文所使用的术语“稀释剂”是指适合于改变或达成如本文所描述的示例性或适当浓度或浓度的溶液。

在各种实施例中，单位剂型含有意图单次使用的量的活性成分 (例如特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段)。在各种实施例中，单位剂型中的活性成分的量约为 0.1 mg 至约 5000 mg、约 100 mg 至约 1000 mg，和约 100 mg 至约 500 mg、约 100 mg 至约 400 mg、约 100 mg 至约 200 mg、约 200 mg 至约 400 mg、约 250 mg 至约 350 mg、约 125 mg 至约 175 mg、约 275 mg 至约 325 mg、约 1 mg 至约 250 mg、约 1 mg 至约 100 mg、约 1 mg 至约 50 mg、约 1 mg 至约 25 mg、约 1 mg 至约 10 mg、约 1 mg 至约 5 mg 或其范围或区间。例如约 2

mg 至约 100 mg 或 2 mg 至 20 mg 的上文所叙述量的中间范围也意图成为本发明的一部分。举例来说，意图包括使用上文所叙述值（或含于上文所叙述范围内的值）中的任一个的组合作为上限值和/或下限值的值范围。在特定实施例中，制剂常常以呈单位剂型的液体形式供应。在一些实施方案中，单位剂型含有 2 至 2.5 mg 或 10 至 11 mg、20 至 25 mg、80 至 90 mg、100 至 125 mg、160 至 180 mg、200 至 225 或 320 至 360 mg、200 至 400mg。在一些实施方案中，根据本发明的单位剂型适合于皮下施用至患者（例如，含有浓度为约 100 mg/ml 或约 150 mg/ml 的抗体的单位剂型）。

在一个实施方案中，本发明提供了在稳定制剂中包含约 20 mg、约 80 mg、约 160 mg、约 200mg、约 320 mg 或约 400mg 的抗体的单位剂型，其中所述制剂包含 200mg 或 400mg 的抗体单位剂型。

本发明还包括制备单位剂型的方法。在示例性实施例中，用于制备医药单位剂型的方法包括在合适容器（例如本文所论述的那些容器）中合并前述实施例中的任一个的制剂。

在各种实施例中，药物制剂含于容器（例如，小瓶或预填充注射器）中，所述容器可含有小于 5 体积%的氧化气体（例如氧气）的顶隙气体。在各个实施例中，容器的顶隙中的氧化气体（例如氧气）的浓度可小于 4.5%、小于 4%、小于 3.5%、小于 3%、小于 2.5%、小于 2% 或小于 1.5%。在一个实施例中，顶隙中的氧化气体（例如氧气）的浓度小于约 1%。在一个实施例中，顶隙中的氧化气体（例如氧气）的浓度不超过约 0.5%。在一个实施例中，顶隙中的氧化气体（例如氧气）的浓度不超过约 0.1%。在各种实施例中，药品容器的顶隙中的氧化气体（例如氧气）的浓度小于 0.9%、小于 0.8%、小于 0.7%、小于 0.6%、小于 0.5%、小于 0.4%、小于 0.3%、小于 0.2% 或小于 0.1%。在一些情况下，顶隙气体中的氧气浓度为约 0.01% 至约 1.5%。在一些情况下，顶隙气体中的氧气浓度为约 0.75% 至约 1.25%。在一些情况下，顶隙气体中的氧气浓度为约 0.05% 至约 0.15%。在各种实施例中，顶隙中的氧化气体（例如氧气）被惰性气体如氮气、氦气、氩气、氖气、氪气或氙气替代或基本上被替代。在一个实施例中，非氧化气体为氮气。在一个实施例中，非氧化气体为氩气。

药物制剂的治疗性用途

本发明的药物制剂尤其适用于治疗、预防和/或改善与表达人 MASP-2 的细胞相关的任何疾病或病症。可以通过施用本发明的药物制剂来治疗的示例性、非限制性疾病和病症包括将受益于抑制 MASP-2 依赖性补体激活的疾病或病症。

在一些实施方案中，所述将受益于抑制 MASP-2 依赖性补体激活的疾病或病症包括自身免疫性疾病、血管病症、缺血再灌注损伤、动脉硬化、炎症、肺部病症、体外再灌注过程、肌肉骨骼病症、肾脏病症、皮肤病症、器官或组织移植过程、神经系统疾病或损伤、血液疾病、泌尿生殖系统疾病、非肥胖型糖尿病或与 1 型或 2 型糖尿病相关并发症、癌症、内分泌疾病、眼科疾病或 COVID-19（新冠肺炎）。

在一些具体的实施方案中，所述自身免疫性疾病包括血栓性微血管病（TMA）、非典型溶血性尿毒症综合征（aHUS）、造血移植相关的血栓性微血管病（TA-TMA）、狼疮肾炎、系统性红

斑狼疮 (SLE) 和 IgA 肾病。

在一些具体的实施方案中, 所述血管病症包括心血管病症、脑血管病症、外周 (如肌肉骨骼) 血管病症、肾血管病症、肠系膜/肠道血管病症、移植物和/或再移植物的血管再生、血管炎、亨-舍二氏紫癜性肾炎、系统性红斑狼疮相关的血管炎、与类风湿性关节炎相关的血管炎、免疫复合物血管炎、大动脉炎、扩张型心肌病、糖尿病血管病、川崎病 (动脉炎)、静脉气体栓塞 (VGE), 以及支架置入术、旋转动脉瘤切除术和经皮腔内冠状动脉成形术 (PTCA) 后的再狭窄。

在一些具体的实施方案中, 所述缺血再灌注损伤包括与主动脉瘤修复、心肺转流、与器官移植和/或肢体/手指再植有关的血管再吻合、卒中、心肌梗死和休克和/或外科手术后的血液动力学复苏有关的缺血再灌注损伤。

在一些具体的实施方案中, 所述炎症包括炎症性胃肠道疾病, 其包括胰腺炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征和憩室炎。

在一些具体的实施方案中, 所述肺部病症包括急性呼吸窘迫综合征、输血相关性急性肺损伤、缺血/再灌注急性肺损伤、慢性阻塞性肺病、哮喘、韦格纳肉芽肿病、抗肾小球基底膜病 (Goodpasture 病); 胎粪吸入综合征、闭塞性细支气管炎综合征、特发性肺纤维化、继发于烧伤的急性肺损伤、非心源性肺水肿、输血相关呼吸困难、肺气肿、囊性纤维化、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 (Covid-19) 相关疾病。

在一些具体的实施方案中, 所述体外循环再灌注过程包括血液透析、血浆去除术、白细胞去除术、体外膜氧合 (ECMO)、肝素诱导体外膜氧合低密度脂蛋白沉淀 (heparin-induced extracorporeal membrane oxygenation LDL precipitation, HELP) 和心肺转流术 (CPB)。

在一些具体的实施方案中, 所述肌肉骨骼病症包括骨关节炎、类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、痛风、神经性关节病、银屑病性关节炎、脊柱关节病、结晶性关节病和系统性红斑狼疮 (SLE)。

在一些具体的实施方案中, 所述肾脏病症包括系膜增生型肾小球肾炎、膜性肾小球肾炎、膜性增生性肾小球肾炎 (系膜毛细血管性肾小球肾炎)、急性感染后肾小球肾炎 (链球菌感染后肾小球肾炎)、冷球蛋白血症性肾小球肾炎、狼疮性肾炎、亨-舍二氏紫癜性肾炎和 IgA 肾病。

在一些具体的实施方案中, 所述皮肤病症包括银屑病、自身免疫性大疱性皮肤病、嗜酸性海绵形成、大疱性类天疱疮、获得性大疱性表皮松解、妊娠疱疹、热烧伤和化学烧伤。

在一些具体的实施方案中, 所述器官或组织移植过程包括器官异体移植、器官异种移植器官和组织移植。

在一些具体的实施方案中, 所述神经系统疾病或损伤包括多发性硬化症、重症肌无力、亨廷顿氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化、格林巴利综合征、卒中后再灌注 (reperfusion following stroke)、退变性椎间盘、脑外伤、帕金森氏病、阿尔茨海默病、Miller-Fisher 综合征、脑外伤和/或出血、脱髓鞘和脑膜炎。

在一些具体的实施方案中, 所述血液病包括败血症、严重败血症、败血症休克、败血症引

起的急性呼吸窘迫综合症、全身炎症反应综合症、失血性休克、溶血性贫血、自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜和溶血性尿毒综合征。

在一些具体的实施方案中，所述泌尿生殖系统病症包括疼痛性膀胱病、感觉性膀胱病、慢性非细菌性膀胱炎、间质性膀胱炎、不孕症、胎盘功能障碍和流产和先兆子痫。

在一些具体的实施方案中，所述内分泌疾病包括桥本氏甲状腺炎、压力、焦虑和激素性疾病，涉及垂体的催乳素、生长素或其他胰岛素样生长因子和促肾上腺皮质激素的调节性释放。

在一些具体的实施方案中，所述眼科疾病包括年龄相关性黄斑变性。

在本文提供的方法的一些实施方案中，受试者被确定为具有升高的C4血清水平，或在有关样品中具有C4d沉积或C4d阳性染色。在一些实施方案中，该条件或疾病是IgA肾病。据报道，C4d阳性染色是IgAN发生ESRD的一个独立风险因素。C4d可以用本领域已知的任何合适的方法进行检测，例如，通过使用ELISA，或免疫荧光显微镜。

本文提供的抗体或抗原结合片段的治疗有效量将取决于本领域已知的各种因素，例如体重、年龄、过去的病史、目前的药物、受试者的健康状况和潜在的交叉反应、过敏、敏感和不良副作用，以及给药途径和疾病发展程度。本领域的普通技术人员（如医生或兽医）可根据这些和其他情况或要求按比例减少或增加剂量。

在某些实施方案中，本文提供的抗MASP-2抗体或抗原结合片段的治疗有效剂量为约0.01mg/kg至约100mg/kg（例如，约0.01毫克/千克，约0.5 mg/kg、约1 mg/kg、约2 mg/kg、约3 mg/kg、约5 mg/kg、约10 mg/kg、约15 mg/kg、约20 mg/kg、约25 mg/kg、约30 mg/kg、约35 mg/kg、约40 mg/kg、约45 mg/kg、约50 mg/kg、约55 mg/kg、约60 mg/kg、约65 mg/kg、约70 mg/kg、约75 mg/kg、约80 mg/kg、约85 mg/kg、约90 mg/kg、约95 mg/kg、或约100 mg/kg）。在其中某些实施方案中，抗体或抗原结合片段的给药剂量为约50mg/kg或更少，在其中某些实施方案中，剂量为10mg/kg或更少，5mg/kg或更少，3mg/kg或更少，1mg/kg或更少，或0.1mg/kg或更少。在某些实施方案中，给药剂量可在治疗过程中改变。例如，在某些实施方案中，初始给药剂量可高于后续给药剂量。在某些实施方案中，给药剂量可根据受试者的反应在治疗过程中变化。

可以调整剂量方案以提供最佳的预期反应（例如，治疗反应）。例如，可以施用单一剂量，或在一段时间内施用几个分割的剂量。

本文公开的抗MASP-2抗体和抗原结合片段可通过本领域已知的任何途径给药，例如肠外（如皮下、腹膜内、静脉内，包括静脉输液、肌肉内或皮内注射）或非肠外（如口服、鼻内、眼内、舌下、直肠或局部）途径。

在一些实施方案中，本文所披露的抗MASP-2抗体或抗原结合片段可单独或与一种或多种额外的治疗手段或药剂联合施用。例如，本文所披露的抗体或抗原结合片段可与另一种治疗剂，如抗自体免疫药物结合使用。

在某些实施方案中，本文所披露的与一种或多种附加治疗剂联合施用的抗MASP-2抗体或抗原结合片段可与一种或多种附加治疗剂同时施用，在某些实施方案中，抗体或抗原结合片段和附加治疗剂可作为同一药物组合物的一部分施用。然而，抗MASP-2抗体或抗原结合片段与

另一种治疗剂 "结合 "使用, 不一定要与该治疗剂同时或在同一组合物中使用。 在另一药剂之前或之后施用的抗MASP-2抗体或抗原结合片段被认为是与该药剂 "联合 "施用, 因为该短语在此使用, 即使该抗体或抗原结合片段和第二药剂是通过不同途径施用。 在可能的情况下, 与本文公开的抗体或抗原结合片段联合施用的额外治疗剂是根据额外治疗剂的产品信息表中列出的时间表, 或根据Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002)) 或本领域中众所周知的方案施用。

本发明的治疗方法包含向个体施用包含如本文所公开的特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段的任何制剂。施用药物制剂的个体可为例如需要此类治疗的任何人类或非人类动物。举例来说, 个体可为诊断患有前述疾病或病症中的任一者或视为处于罹患前述疾病或病症中的任一者的风险下的个体。本发明进一步包括本文所公开的药物制剂中的任一种在制造用于治疗与表达人 MASP-2 的细胞相关的任何疾病或病症的药剂中的用途, 所述任何疾病或病症包括上文所提及的示例性疾病、病症和病况中的任一者。

在一些实施方案中, 本发明提供包含如本文所论述的药物制剂 (例如具有制剂或单位剂型的容器) 和包装或标签 (例如药品说明书) 以及药物制剂使用说明书的试剂盒以治疗如上文所论述的疾病或病症。在一些情况下, 说明书提供如本文所论述的单位剂型用于治疗疾病或病症的用途。

具体实施方式

以下实施例的目的是便于向本领域技术人员提供如何制造和使用本发明的方法和组合物的完整公开内容和描述, 且并不意在限制本发明所要求保护的的范围。已努力确保关于所用数字 (例如量、温度等) 的准确性, 但还应考虑一些实验误差和偏差。除非另有指示, 否则份数为重量份, 分子量为平均分子量, 温度以摄氏度计, 且压力为大气压或接近大气压。

注: 本发明表格中的 NT 若无特别说明, 表示未检测; ND 若无特别说明, 表示未检出。

实施例 1: 人、小鼠、食蟹猴 MASP-2 抗原的产生

1. 表达用抗原的构建

为了将抗体的表位限制在人MASP-2的补体结合和激活结构域上, 我们设计了一种用于动物免疫的嵌合抗原。合成了表达小鼠MASP-2 CUB1-EGF-CUB2结构域 (SEQ ID NO: 40的残基20-297) 和人MASP-2 CCP1-CCP2-SP结构域 (SEQ ID NO: 39的残基298-686) 的编码序列。此外, 在N端添加IL-2分泌信号肽序列 (SEQ ID NO:41), 在C端加入FLAG标签序列。上述元件被组合成一个开放阅读框 (ORF), 制成一个嵌合抗原表达构建体 (SEQ ID NO:42)。其他表达全长人MASP-2 (SEQ ID NO:39)、小鼠MASP-2 (SEQ ID NO:40) 和食蟹猴MASP-2 (SEQ ID NO:43) 的构建体, 在C端加入HIS标签, 通过合成制成。另外, 通过PCR方法制作了另一个表达全长的人MASP-2 (SEQ ID NO:39) 并在C端带有FLAG标记的构建体。

人 MASP-2 蛋白(SEQ ID NO:39)

MRLLTLLGLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPGFPGEYANDQERRWTLTAPPGYRLRLRYFT
HFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQESTDTERAPGKDTFYSLGSSLDITFRSDYSNEK
PFTGFEAFYAAEDIDECQVAPGEAPTCDHHCHNHLGGFYCSCRAGYVLHRNKRTCALSALCSGQ
VFTQRSGELSSPEYPRYPKLSSCTYSISLEEGFSVILDFVESFDVETHPETLCPYDFLKIQTRE
EHGPFPGKTLPHRIETKSNTVTITFVTDES GDHTGWKIHYTSTAQPCPYPMAPPNGHVSPVQA
KYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPLKSFTA VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYI
TGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTT
GGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYEQKHDASALDIRMGT
LKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTD
DIGTASGWGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQKCTAA YEKPPYPRGSVTANMLCAGLES GGK
DSCRGDSSGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF

小鼠 MASP-2 蛋白(SEQ ID NO:40)

MRLILFLGLLWSLVATLLGSKWPEPVFGRLVSPGFPEKYADHQDRSWTLTAPPGYRLRLRYFT
HFDLELSYRCEYDFVKLSSGTKVLATLCGQESTDTEQAPGNDFYSLGPSLKVTFHSDYSNEK
PFTGFEAFYAAEDVDECRVSLGDSVPCDHYCHNYLGGYYCSCRAGYVLHQNKHTCSALCSG
QVFTGRSGYLSSPEYPQYPKLSSCTYSIRLEDGFSVILDFVESFDVETHPEAQCPYDSLKIQT
KGEHGPFPGKTLPPRIETDSHKVTITFATDESGNHTGWKIHYTSTARPCPDPTAPPNGSISPVQ
AIYVLKDRFSVFCKTGFELLQGSVPLKSFTA VCQKDGSWDRPMPECSI IDCGPPDDL PNGHVD
YITGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMSSNGKYVCEADGFWTSSKGEKLPVCEPVCGLSTHTIG
GRIVGGQPAKPGDFPWQVLLLGQTTAAGALIHNDWVLTA AHAVYEKMAASSLNIRMGIL
KRLSPHYTQAWPEEIFIHEGYTHGAGFDNDIALIKLKNKVTINGSIMPVCLPRKEAASLMRTD
FTGTVAGWGLTQKGLLARNLMFVDIPIADHQKCTA VYEKLYPGVRV SANMLCAGLETGGK
DSCRGDSSGALVFLDNETQRWFVGGIVSWGSINCGAADQYGVYTKVINYIPWIENIISNF

IL-2 分泌信号肽序列(SEQ ID NO:41)

MYRMQLLSCI ALSLALVTNS

嵌合 MASP-2 蛋白(SEQ ID NO: 42)

MYRMQLLSCIALSLALVTNSSKWPEPVFGRLVSPGFPEKYADHQDRSWTLTAPPGYRLRLRYF
THFDLELSYRCEYDFVKLSSGTKVLATLCGQESTDTEQAPGNDFYSLGPSLKVTFHSDYSNE
KPFTGFEAFYAAEDVDECRVSLGDSVPCDHYCHNYLGGYYCSCRAGYVLHQNKHTCSALCS
GQVFTGRSGYLSSPEYPQYPKLSSCTYSIRLEDGFSVILDFVESFDVETHPEAQCPYDSLKIQT
DKGEHGPFPGKTLPPRIETDSHKVTITFATDESGNHTGWKIHYTSTAQPCPYPMAPPNGHVSP
VQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPLKSFTA VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGR
VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSA
RTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYEQKHDASALDIR
MGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESF
MRTDDIGTASGWGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQKCTAA YEKPPYPRGSVTANMLCAGLE
SGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIIS
DFDYKDDDDK

食蟹猴 MASP-2 蛋白(SEQ ID NO: 43)

MRLTLGLLGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPGFPGEYANDQERRWTLTAPPGYRLRLRYFT
 HFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGHESTDTERAPGNDTFYSLGSSLDITFRSDYSNEK
 PFTGFEAFYAAEDIDECQVAPGEAPACDHHCHNHLGGFYCSCRVGYILHRNKRTCSALCSGQ
 VFTQRSGELSSPEYPQYPKLSSTYSIRLEEGFSVILDFVESFDVETHPETLCPYDFLKIQIDSE
 EHGPFCGKTLPRRIETKSNTVTITFVTDESGDHTGWKIHYTSTAQPCPYPMAPPNGHLSPVQA
 KYILKDSFSIFCEPGYELLQGHLPKSF AAVCQKDGSWDQPMPPSCSIVDCGPPDDLPSGRVEYI
 TGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSK GERSPPVCEPVCGLSARTTG
 GRIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGSTAAGALLYDNWVLTAAHAIYEQKHDASSLDIRLGALK
 RLSPHYTQAWAEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNKVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDI
 GTASGWGLTQRGLLARNLMYVDIPIVDHQKCTAAAYEKPPYSGGSVTANMLCAGLES GGKDS
 CRGDSGGALVFLDNETQRWFVGGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIKNIISNF

2.MASP-2抗原的表达和纯化

用ExpiFectamine CHO转染试剂盒将上述的MASP-2表达构建体分别转染到ExpiCHO-s细胞。ExpiCHO-s细胞在无血清的ExpiCHO表达培养基中培养。转染后14天,收集上清液。离心和过滤后,上清液被加载到抗FLAG或抗HIS柱上,然后用GE AKTA纯化系统进行纯化。清洗后, MASP-2蛋白用柠檬酸(pH3.5)洗脱,用于动物免疫。

实施例 2: MASP-2 抗体的产生

1. 免疫接种和杂交瘤融合

经由Helios基因枪系统(Bio-Rad)用表达上述嵌合MASP-2抗原的DNA对不同品系的小鼠或大鼠进行免疫。每两周用重组MASP-2蛋白对免疫的动物进行加强。在最后一次加强免疫的4天后,处死动物进行杂交瘤融合。分离脾脏细胞并经由电融合方法与SP2-0细胞融合。得到的杂交瘤细胞在含有次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷的DMEM培养基中培养。

2. 杂交瘤筛选

培养10天后,收集杂交瘤上清液进行抗原结合筛选。全长的人MASP-2蛋白以0.5 μ g/ml的浓度包被在ELISA板中,每孔100 μ l。用含有1%BSA+1%正常山羊血清+0.05%Tween20的PBS封闭后,将杂交瘤上清液加入板中1小时。用辣根过氧化物酶(HRP)连接的抗鼠抗体检测杂交瘤抗体与人MASP-2的特异性结合。挑选出ELISA结合的阳性克隆,进行进一步的活性筛选。

3. 活性筛选

ELISA板用10 μ g/ml甘露聚糖包被,每孔100 μ l,4 $^{\circ}$ C过夜。用PBS+0.1% Tween20洗涤3次后,用封闭缓冲液(10mM Tris-HCl+0.1%人血清白蛋白+140mM NaCl)封闭平板1小时。将50 μ l杂交瘤上清液与50 μ l用检测缓冲液(0.1%人血清白蛋白+20 mM Tris-HCl+2 mM CaCl₂+140 mM NaCl+1 mM MgCl₂+0.05% Tween20)稀释的1%人血清(Quidel, A113)混合,然后在冰上孵育45分钟。将封闭缓冲液从甘露聚糖包被平板上弃去,并加入上清液-血清混合物。将平板在37 $^{\circ}$ C下孵育1.5小时。用洗涤缓冲液洗涤3次后,通过测量C4b的沉积来监测C4的激活。沉积的C4b通过HRP连接的抗C4c抗体(Quidel-A211)检测。如果MASP-2的活性被抗体所抑制,则沉积在平

板底部的C4b就会减少。通过使用这种方法，选择具有MASP-2抑制活性的杂交瘤抗体。

然后对阳性抗体进行亚克隆，并通过ELISA结合和C4激活试验进行重新筛选。

实施例3: 抗人MASP-2抗体的抑制活性的表征。

1. 杂交瘤抗体的纯化

亚克隆后，将具有中和活性的阳性杂交瘤克隆在10cm皿中扩增。离心过滤后，将含抗体的上清液装入蛋白A柱，用GE AKTA纯化系统进行纯化。清洗后，用柠檬酸（pH3.5）洗脱抗体。

2. 纯化抗体的活性评估

MASP-2是凝集素途径的一个关键成分，它可以裂解补体因子C4和C2，生成C3转化酶C4bC2a。C3的激活最终导致了膜攻击复合物（MAC）的形成。为了测试抑制MASP-2的抗体是否能减少凝集素途径的激活，在纯化的MASP-2抗体存在的情况下，对C4、C3和MAC的激活进行了评估。

ELISA板用10 μ g/ml甘露聚糖包被，每孔100 μ l，4 $^{\circ}$ C过夜。用PBS + 0.1% Tween20洗涤3次后，用封闭缓冲液（10 mM Tris-HCl + 0.1%人血清白蛋白 + 140 mM NaCl）封闭平板1小时。用含有1%人血清（Quidel, A113）的检测缓冲液（0.1%人血清白蛋白+20mM Tris-HCl+2mM CaCl₂+140mM NaCl+1mM MgCl₂+0.05% Tween20）连续稀释抗体并在冰上孵育45分钟。将封闭缓冲液从甘露聚糖包被平板上弃去，加入抗体-血清混合物。将平板在37 $^{\circ}$ C下孵育1.5小时。激活的补体成分应沉积在板的底面，而未激活的成分仍可溶于缓冲液。用洗涤缓冲液洗涤3次后，用HRP连接的补体抗体，包括抗C3c抗体（Quidel-A205）、抗C4c抗体（Quidel-A211）和抗MAC（SC5b-9）抗体（Quidel-A239）监测补体成分的激活。检测抗体是在内部用HRP连接的。从杂交瘤细胞中纯化的MASP-2抗体以剂量依赖的方式阻止了补体C3（见图1）、补体C4（见图2）和MAC（见图3）的激活。

实施例4: V型基因的克隆和嵌合抗体的生成

1. 杂交瘤抗体的V型基因克隆和测序

挑选出具有理想特征的主导抗体进行V型基因克隆。通过聚合酶链反应（PCR）扩增技术获得鼠抗人MASP-2轻链和重链可变区的序列。用MiniBest Universal RNA Extraction Kit (TaKaRa) 分离出阳性杂交瘤细胞的总RNA，用1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 与Oligo (dT) 引物合成cDNA。通过PCR扩增小鼠IgG基因的可变区域，重链可变区域使用不同同型的引物，轻链可变区域使用Kappa链引物。PCR产物被亚克隆到一个TA克隆载体中。对于每个可变基因构建体，将10个以上的单克隆用于由Synbio Technologies（中国苏州）进行DNA测序。VH和VK的氨基酸序列由DNA测序结果得出。

2. 嵌合抗体的构建

三个不同序列的抗体，包括129C10、160D10和125D5，被选为产生嵌合抗体的先导抗体，其SEQ列于表1和表2。经过测序分析和确认，合成了重链和轻链可变区的cDNA，并与人IgG4和

人kappa的恒定区序列相融合。为了提高抗体的分泌，在重链和轻链的N端分别加入了信号肽序列。得到的嵌合抗体基因被克隆到表达载体中。通过使用Qiagen公司的Plasmid Maxi-prep System制备大规模的DNA。

3.嵌合抗体的表达和纯化

根据制造商的协议，使用Invitrogen公司的ExpiFectamine™ CHO试剂进行重链和轻链的共转染。使用ExpiFectamine™ CHO试剂将ExpiCHO-S细胞在ExpiCHO表达培养基中以 $5-6 \times 10^6$ 细胞/ml的浓度转染等量的最终浓度为 $0.8 \mu\text{g/ml}$ 的重链载体和轻链载体DNA。将质粒DNA或ExpiFectamine™ CHO试剂用冷的OptiPRO™培养基稀释，然后通过旋转试管和/或倒置混合。将ExpiFectamine™ CHO/质粒DNA混合物在室温下孵育1-5分钟，然后慢慢转移到装有细胞的摇瓶中。转染的细胞在 37°C ， $5\% \text{CO}_2$ 的湿润气氛下，在轨道摇床（125rpm的摇动速度）上培养。转染后18至22小时，加入ExpiCHO™ Feed，并在第10天收获条件培养基。将上清液以4,000rpm的速度离心20分钟，然后通过 $0.22 \mu\text{m}$ 的过滤囊过滤以去除细胞碎片。过滤后的上清液被装入预平衡的Protein-A亲和柱。用平衡缓冲液（PBS）清洗Protein-A树脂，然后用25mM柠檬酸盐（pH3.5）来洗脱抗体。用1M Tris-base（pH9.0）将纯化的抗体溶液调节到pH6.0-7.0。内毒素被控制在1 EU/mg以下。最后，纯化的抗体通过SDS-PAGE进行鉴定。

实施例5:人源化抗体的产生和特性化

1.人源化抗体的产生、表达和纯化

小鼠抗体129C10的可变区结构域的序列被用来确定与各自小鼠框架具有最高同源性的胚系序列。使用计算机建模设计带有CDR嫁接和回复突变的人源化变体。

129C10

人胚系框架序列VH/1-2用于重链，VK/2-30用于轻链，分别用于CDR嫁接。

重链（HC）变体1、2、3和4是通过将三个CDR直接嫁接到胚系序列（SEQ ID NO: 37），此外，分别对于HC变体1有R71V、A93T突变（SEQ ID NO:20），对于HC变体2有R71V，A93T，V67A，M69L突变（SEQ ID NO: 22），对于HC变体3有R71V，A93T，A65G，K64Q，E61Q突变（SEQ ID NO: 24）和对于HC变体4有R71V，A93T，V67A，M69L，A65G，K64Q，E61Q突变（SEQ ID NO: 26）而得到的。应该注意的是，HC变体3和4有3个突变（A65G，K64Q，E61Q）被引入HC CDR2中，以进一步提高抗体的人源化。

129C10 HC的胚系序列：

VH/1-2（129C10-HC胚系，SEQ ID NO: 37）。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTN
YAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCAR

VH/1-2变体1（Hu129C10_Ha，SEQ ID NO: 20）。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYINWVRQAPGQGLEWMGWIFPGSESAYH
SEKFKARVTMTVDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCTRGDRSGPFAYWGQGLTVTVSS

VH/1-2变体2（Hu129C10_Hb，SEQ ID NO: 22）。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIFPGSESAYH
SEKFKARATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTRGRSGPFAYWGQGLTVTVSS
VH/1-2变体3 (Hu129C10_Hc, SEQ ID NO: 24)。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIFPGSESAYH
SQKFQGRVTMTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTRGRSGPFAYWGQGLTVTVSS
VH/1-2变体4 (Hu129C10_Hd, SEQ ID NO: 26)。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIFPGSESAYH
SQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTRGRSGPFAYWGQGLTVTVSS

轻链(LC)变体1和2是通过将三个CDR直接嫁接到胚系序列(SEQ ID NO: 38)，另外，分别对于LC变体1有F36L回复突变(SEQ ID NO: 28)和对于LC变体2有F36L、T69A回复突变(SEQ ID NO: 30)而得到的。

129C10 LC的胚系序列

VK/2-30 (129C10-LC-胚系, SEQ ID NO: 38)

DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP

VK/2-30变体1 (Hu129C10_La, SEQ ID NO: 28)。

DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQVTHFPFTFGQGTKLEIK

VK/2-30变体2 (Hu129C10_Lb, SEQ ID NO: 30)。

DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGV
PDRFSGSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCVQVTHFPFTFGQGTKLEIK

合成了上述重链和轻链的可变区的cDNA，然后与人IgG4和人kappa的恒定区的序列相融合。得到的抗体基因序列被克隆到一个表达载体中。使用Qiagen公司的Plasmid Maxiprep系统制备大规模的DNA，并根据制造商的协议使用Invitrogen公司的ExpiFectamine™ CHO试剂进行细胞转染。当细胞活力超过60%时收获上清液，并通过0.22微米的过滤囊过滤以去除细胞碎片。过滤后的上清液随后被加载到一个预平衡的Protein-A亲和柱上。用平衡缓冲液(PBS)清洗蛋白A树脂，然后用25 mM柠檬酸盐(pH3.5)洗脱抗体。用1M Tris-base (pH9.0)将纯化的抗体溶液调节到pH6.0-7.0。内毒素被控制在1 EU/mg以下。最后，纯化的抗体通过SDS-PAGE进行鉴定。

还构建了基准抗体OMS721-analog和129C10-hu-YTE (Hu129C10_HaLa-hIgG4并具有氨基酸取代M252Y/S254T/T256E[YTE])，见表2-3)，表达和纯化过程与上述相同。

实施例6: 嵌合型和人源化MASP-2抗体的阻断活性

将纯化的抗体从100µg/ml开始连续稀释，得到一个梯度浓度。补体C3激活试验用于评估MASP-2抗体的阻断活性，如实施例3所述。将每孔100µl的10µg/ml甘露聚糖包被在ELISA板上，在4℃下过夜。将抗体与1%人血清(Quidel, A113)在冰上孵育45分钟。洗涤和封闭板后，加入抗体-血清混合物并在37℃下孵育90分钟。清洗后，用HRP连接的抗C3c抗体(Quidel-A205)检测沉积的活化C3。图4显示了嵌合抗体和人源化抗体对补体C3激活的阻断活性。由于人源化的

129C10变体129C10HaLa显示出最好的亲和力和C3阻断活性，129C10HaLa被选为进一步的体外和体内研究的主导抗体，并被命名为129C10-hu。

实施例7:先导抗体129C10-hu与基准抗体OMS721-analog之间阻断补体C4和MAC的活性比较

1.阻断补体C4和MAC激活的活性比较

使用实施例3中描述的检测方法，对先导MASP-2抗体129C10-hu和OMS721-analog在2%人血清中对补体C4和MAC激活的阻断活性进行了比较。将每孔100 μ l的10 μ g/ml甘露聚糖包被在ELISA板上，在4 $^{\circ}$ C下过夜。将抗体与2%人血清（Quidel, A113）在冰上孵育45分钟。洗涤和封闭板后，加入抗体-血清混合物，在37 $^{\circ}$ C下孵育90分钟。清洗后，用HRP连接的抗C4c抗体（Quidel-A211）检测沉积的活化C4。对于MAC的激活，用HRP连接的抗MAC（SC5b-9）抗体（Quidel-A239）检测。如图5和图6所示，结果表明，相比于OMS721-analog，129C10-hu在阻断补体C4（IC₅₀: 0.11 μ g/mL vs. 1.70 μ g/mL）和MAC（IC₅₀: 0.27 μ g/mL vs. 1.97 μ g/mL）的激活方面更强效约10倍。

2.不同浓度血清中的活性比较

不同浓度（1%、10%和50%）的人血清被用于补体C3激活试验。对于1%和10%的人血清，检测方法与实施例3中所述相同。对于50%的人血清，以1 μ g/ml的浓度包被甘露聚糖，每孔100 μ l，4 $^{\circ}$ C过夜。用PBS+0.1% Tween20洗涤3次后，用封闭缓冲液（10mM Tris-HCl+0.1%人血清白蛋白+140mM NaCl）封闭平板1小时。用含有50%人血清（Quidel, A113）的测定缓冲液（0.1%人血清白蛋白+20 mM Tris-HCl+2 mM CaCl₂+140mM NaCl+1 mM MgCl₂+0.05% Tween20）连续稀释抗体，然后在冰上孵育45分钟。将封闭缓冲液从甘露聚糖包被的平板上移走，加入抗体-血清混合物。平板在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。清洗3次后，用HRP连接的抗C3c抗体（Quidel-A205）检测活化的C3。如图7所示，129C10-hu和OMS721-analog对1%血清中的C3激活有类似的抑制功效（IC₅₀: 0.08 μ g/mL vs. 0.10 μ g/mL）。有趣的是129C10-hu在10%血清的高浓度下表现出比OMS721-analog高3倍的效力（IC₅₀: 0.20 μ g/mL vs. 0.69 μ g/mL）（见图8）。更重要的是，在50%的血清浓度下，129C10-hu仍然具有阻断C3激活的活性，IC₅₀为0.05 μ g/mL，而OMS721-analog则失去活性（见图9）。对于阻断C4的激活，129C10-hu在10%的人血清中也显示出比OMS721-analog高2倍的效力（IC₅₀: 0.69 μ g/mL vs. 1.59 μ g/mL）（见图10）。

实施例8:通过生物层干涉仪（ForteBio）检测MASP-2抗体与人MASP-2的结合亲和力

用ForteBio动力学缓冲液（PBS pH 7.4, 0.1% BSA + 0.002% Tween-20）将待测抗体稀释到100 nM的浓度。用动力学缓冲液稀释人MASP-2蛋白，得到100 nM、50 nM和25 nM三个浓度的梯度。0 nM被用来作为参考对照。抗体被固定在Protein A生物传感器上。检测基线60秒，然后检测抗体与MASP-2的结合180秒，得到K_{on}因子数据。随后在动力学缓冲液中解离180秒，得到K_{off}因子数据。生物传感器的再生是在10mM甘氨酸，pH2.0的缓冲液中。所有的动力学数据都是在30 $^{\circ}$ C下收集的。数据是通过使用ForteBio Octet RED96获取，并通过Octet Data Analysis软件进行分析。如表3所示，所有测试的MASP-2杂交瘤抗体与人MASP-2有很高的结合亲和力，KD值

从 10^{-10} M到 10^{-8} M。人源化后，主导抗体129C10-hu (129C10-HaLa) 与hMASP-2保持最高的结合亲和力, KD值 $<10^{-12}$ M (达到ForteBio的检测极限) (表4), K_{on} 值为 $3.53E+4$, K_{off} 值为 $<1.0E-7$ (见图11)。

表 3 MASP-2杂交瘤抗体的结合亲和力

样品	亲和力		
	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
129C10H2C1	7.46E-10	6.40E+04	4.78E-05
160D10	2.78E-08	3.61E+04	1.00E-03
77C1H1E1	1.18E-09	6.96E+04	8.20E-05
128D5G3H2	1.05E-09	8.39E+04	8.81E-05
125D5G1G2	1.64E-09	5.94E+04	9.73E-05
160F3E1G5	1.41E-09	7.09E+04	1.00E-04
80C12G2F10	4.49E-09	9.25E+04	4.15E-04
115H10B3E4	7.20E-10	7.29E+04	5.24E-05

表 4 MASP-2人源化或嵌合抗体的结合亲和力

样品	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
129C10HaLa	$<1.0E-12$	$3.53E+04$	$<1.0E-07$
129C10HbLa	$<1.0E-12$	$3.29E+04$	$<1.0E-07$
129C10HbLb	$<1.0E-12$	$3.29E+04$	$<1.0E-07$
129C10HcLb	$1.36E-09$	$3.37E+04$	$4.56E-05$
129C10HaLb	$1.14E-08$	$2.55E+04$	$2.91E-04$
129C10HdLb	$<1.0E-12$	$3.60E+04$	$<1.0E-07$
129C10HdLa	$1.71E-08$	$2.49E+04$	$4.25E-04$
129C10HcLa	$<1.0E-12$	$3.52E+04$	$<1.0E-07$
129C10chiIgG4	$8.02E-09$	$2.57E+04$	$2.06E-04$
160D10chiIgG4	$9.84E-10$	$3.40E+04$	$3.34E-05$
125D5chilgG4	$1.95E-08$	$2.56E+04$	$4.99E-04$
OMS721-analog	$7.40E-09$	$4.16E+04$	$3.08E-04$

实施例9:通过ELISA检测129C10-hu的结合特异性

人C1s/C1r、MASP-1/3均购自R&D、Cusbio等。将重组人补体成分C1s/C1r、MASP-1或MASP-3 (1mg/ml) 在 4°C 下包被过夜; 用洗涤缓冲液洗涤三次; 在 4°C 下加入封闭缓冲液 (200 μL /孔) 1h; 洗涤三次; 在RT下加入连续稀释的Ab 1h; 洗涤三次; 加入小鼠抗人IgG4 HRP (1:20000), 在RT下1小时; 洗涤三次; 用四甲基联苯胺 (TMB) 在OD450nm下检测40分钟。129C10-Hu和

OMS721-analog与C1s、C1r、MASP1、MASP2或MASP3结合的EC50分别显示在图12A-12E。结果显示，129C10-Hu只与人MASP2结合，而不与人C1s、C1r、MASP1或MASP3结合。

实施例10:通过ELISA对129C10-hu进行交叉反应

大鼠/小鼠MASP-2是向Cusbio公司订购的。人/食蟹猴MASP-2是在内部生成的。ELISA测定按以下程序进行。将不同物种的MASP2 (1 μ g/ml) 在4 $^{\circ}$ C下包被过夜; 用洗涤缓冲液洗涤三次; 在RT下加入封闭缓冲液 (200 μ L/孔) 2小时; 洗涤三次; 在RT下加入连续稀释的129C10-hu或作为对照的OMS721-analog 1小时; 洗涤三次; 在RT下加入小鼠抗人IgG4 Fc HRP (1: 20000) 1小时; 洗涤三次; 用TMB在OD450 nm下检测2分钟。129C10-Hu和OMS721-analog与不同物种的MASP-2的结合EC50分别见图13A和图13B。

实施例11:129C10-hu与食蟹猴MASP-2的交叉反应性, 通过使用食蟹猴血清中的C4激活测定

除了使用食蟹猴的血清外, 测定方法与实施例3中描述的相同。每孔100 μ l, 10 μ g/ml甘露聚糖包被在ELISA板上, 4 $^{\circ}$ C过夜。将抗体与1%食蟹猴的血清在冰上孵育45分钟。洗涤和封闭板后, 加入抗体-血清混合物, 然后在37 $^{\circ}$ C下孵育90分钟。清洗后, 用HRP连接的抗C4c抗体 (Quidel-A211) 检测沉积的活化C4。如图14所示, 129C10阻断了食蟹猴的C4激活, 其IC₅₀ 为0.4973 μ g/ml, 表明129C10可以与食蟹猴MASP-2结合, 阻断其活性。

实施例12:129C10在阻断MB-Lectin补体途径的激活方面的选择性

有3条途径可以启动补体激活: 经典途径、MB-Lectin (MBL) 途径和替代途径。这些途径的启动依赖于不同的分子, 而它们汇聚在一起产生同一套效应分子, 如膜攻击复合物 (MAC)。这三种途径都是先天免疫的重要组成部分, 在防御不同的感染中发挥不同的作用 (Norris M, et. Al. 2013. JM.)。接下来, 测试了129C10-hu阻断MBL途径的选择性。

Wieslab补体系统筛选试剂盒 (IBL America, Cat# COMPL 300 RUO) 被用来确定主导抗体129C10-hu的选择性。板上预包被有甘露聚糖作为MBL途径的启动剂, IgM作为经典途径的启动剂, LPS作为替代途径的启动剂。用含有人类血清 (Quidel, A113) 的测定缓冲液连续稀释129C10-hu, 然后在冰上孵育45分钟。将抗体-血清混合物加入平板中, 在37 $^{\circ}$ C下孵育60分钟。清洗后, 用AP连接的抗C5b-9抗体检测沉积的MAC。EDTA被用来作为阻断补体激活的阳性对照。如图15a-15C所示的结果, 129C10-hu只阻断了从MBL途径启动的补体激活, 而不是其他两条补体途径, 这表明129C10-hu抗体选择性地阻断了MBL途径的补体激活。

实施例13: 通过在Fc处引入YTE突变来延长129C10-hu的半衰期。

Dall'Acqua WF等人报告说, 在IgG的Fc部分引入三重突变M252Y/S254T/T256E (YTE) 可以增强其与FcRn的结合亲和力并延长其在体内的半衰期 (Dall'Acqua WF, et.al. 2006. JBC)。Motavizumab-YTE是人类第一个YTE突变的IgG, 在I期临床试验中显示出良好的耐受性和延长的半衰期 (Robbie, G. J., et. al. 2013. AAC)。

我们将这种M252Y/S254T/T256E (YTE) 突变引入129C10-hu, 生成129C10-hu-YTE。用生物层干涉仪 (ForteBio) 评估了它与FcRn的结合亲和力。129C10-hu或129C10-hu-YTE用ForteBio动力学缓冲液 (PBS pH 7.4, 0.1% BSA + 0.002% Tween-20) 稀释到500 nM、167 nM、56 nM、19 nM和0 nM的系列浓度。带His标签的人FcRn (FCGRT&B2M) 蛋白用动力学缓冲液稀释到100 nM的浓度梯度。FcRn蛋白被固定在Ni-NTA生物传感器上。记录和分析了缔合和解离的动力学过程。如图16A、图16B和表5所示, YTE突变使129C10-hu与人FcRn的结合亲和力增加了3倍。

表 5 129C10-hu和129C10-hu-YTE与人FcRn的结合亲和力

样品ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
129C10-hu	6.10E-09	5.20E+05	3.17E-03
129C10-hu-YTE	1.88E-09	5.36E+05	1.01E-03

实施例14: MASP-2抗体 129C10-hu和129C10-hu-YTE在食蟹猴中的药代动力学 (PK) /药效动力学 (PD) 研究

每组2只食蟹猴静脉注射10 mg/kg 129C10-hu、129C10-hu-YTE或OMS721-analog。在输液后0、0.5、2、8、24、48、72、96、168、336、504、672、840小时收集血清样品。测试了血清中的抗体浓度和凝集素途径激活的效力。

血清浓度用开发的ELISA方法测定, 检测范围为0.625-40 ng/mL。微孔板上预包被有人IgG特异性抗IgG抗体[R10z8c6]。封闭后, 加入标准 (STD)、质控 (QC) 样品、基质空白样品和测试样品。洗涤后, 将生物素小鼠抗人IgG4加入微孔板孔中, 随后加入用HRP标记的链霉亲和素。在微孔板孔中加入TMB。通过与同时分析的标准曲线进行比较, 将质控和测试样品的OD值转换为浓度, 根据四参数的逻辑模型进行回归。

对于凝集素途径的激活效力测试, 将10 μ g/ml甘露聚糖包被在ELISA板上。用C4激活缓冲液将食蟹猴血清样品稀释到2%。洗涤和封闭平板后, 加入稀释的血清并在37 $^{\circ}$ C下孵育90分钟。清洗后, 用HRP连接的抗C4c抗体 (Quidel-A211) 检测沉积的活化C4。

如图17和表6所示的PK结果, 129C10-hu在食蟹猴中的半衰期164.77小时比OMS721-analog (130.152小时)长。YTE突变使129C10-hu的半衰期增加到274.404小时。如图18所示的PD结果, 抗体给药0.5小时后, 凝集素途径的激活效力被抑制到基础水平。抑制效果在OMS721-模拟组持续2周, 在129C10-hu组持续3周, 在129C10-hu-YTE组持续约4周。

表 6 食蟹猴PK试验的数据汇总

PK参数	单位	129C10-hu 10mpk	129C10-hu-YTE 10mpk	OMS721-analog 10mpk
t1/2	h	164.777	274.404	130.152
Cmax	ng/ml	277231.420	278092.525	102730.925
AUC 0-t	ng/ml*h	39897468.881	56133410.517	17892207.152

Cl_obs	ml/day/kg	5.894	3.725	13.270
--------	-----------	-------	-------	--------

在另一项单独的研究中，雄性和雌性食蟹猴被分配到五组，每组2雄性和2雌性，通过皮下注射0（溶媒对照）、15、20和295.8 mg/kg 129C10-hu，或通过静脉注射15 mg/kg 129C10-hu，注射量为3 mL/kg，持续4周（多达五次）。溶媒对照文章使用药物配方缓冲液。

在用药前并分别在第一剂（见图19）和第四剂（见图20）后约0.083、2、6、24、48、96和168小时采集血样。血清中的补体4c（C4c）用酶联免疫吸附试验（ELISA）进行分析。简而言之，甘露聚糖（Sigma）用包被缓冲液稀释到10 μ g/ml。在96孔板的每个孔中加入100 μ l的甘露聚糖工作溶液。将平板在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。洗涤平板三次，然后加入200 μ l封闭缓冲液，在室温下孵育1h。用C4激活缓冲液将猴血清稀释至2%。在96孔板中加入100 μ l稀释后的血清，在37 $^{\circ}$ C下孵育70分钟。用洗涤缓冲液清洗平板三次。加入100 μ l HRP连接的抗C4c抗体（用封闭缓冲液稀释为1:5000），在室温下孵育1小时。用洗涤缓冲液清洗平板三次。在96孔板的每个孔中加入100 μ l TMB底物溶液，在室温下孵育5-10分钟。向每孔板中加入50 μ l终止液。在450纳米处读取平板。在450纳米处的光密度（OD450）值表示为单个值，并计算每个动物每个时间点的平均值。

在第一次和第四次用药后，血清C4c在 ≥ 15 mg/kg时出现剂量依赖性降低，在皮下用药的动物中给药后2小时开始出现，在经由I.V.用药的动物中给药后0.083小时开始出现，通过S.C或I.V.给药的3个剂量水平在整个用药期间，效果持续存在，在第一剂量后24-96小时具有最大效果，注意到通过S.C.给药的剂量为295.8mg/kg时，与基线值相比，最大平均降幅在雄性动物中高达88.4%，在雌性动物中高达92.8%。总之，在每周一次以剂量为15、60或295.8mg/kg通过S.C.或I.V.给药5个剂量后，129C10-hu对猴血清C4c有明显的剂量依赖性降低作用，表明血清C4c可能是一个潜在的药效学标志物。

实施例 15: 抗体制剂研究的材料与amp;方法

本发明制剂研究中选用的蛋白即抗体分子以 129C10-hu-YTE 为示例进行考察。

本发明所用的仪器设备参见如下表 7，耗材参见如下表 8，试剂参见如下表 9。

表 7 仪器设备

设备名称	品牌	型号
纯化水机	Millipore	Milli-Q Advantage A10
分析天平	Mettler Toledo	ML204T/ 02
磁力搅拌器	WIGGENS	MIX 6
渗透压仪	Advanced	OsmoPRO
pH计	Mettler Toledo	S220
紫外分光光度计	Thermo Scientific	Nano Drop 2000
超净台	AIRTECH	VS-1300L-U
-80 $^{\circ}$ C冰箱	Haier	DW-86L490J

40° C稳定箱	Memmert	HPP400
25° C稳定箱	Memmert	ICH110L
2-8° C冰箱	Haier	HYC-1378
澄明度检测仪	Tianda Tianfa	YB-2
微流成像系统	Protein Simple	368-WPR2
酶标仪	PerkinElmer	2105 Model
动态光散射仪	WYATT	NanoPro
差示扫描量热仪	TA	Nano DSC
离心机	Eppendorf	5804R

表 8 耗材

耗材名称	厂家	货号
0.22 μm PVDF膜	Millipore	SLGVR33RS
13 mm 橡胶塞	West Pharma Packaging	7002-0664
13 mm 铝盖	West Pharma Packaging	54133001
20 mm 橡胶塞	West Pharma Packaging	1970-0022
20 mm 铝盖	West Pharma Packaging	5420-3603
2R西林瓶	Schott Glass Technologies	1542306
6R西林瓶	Schott Glass Technologies	1546216
5 mL PC瓶	Fisher	3500-05

表 9 试剂

试剂名称	厂家	级别	货号
醋酸	J.T Baker	Multi-Compendial, GMP Manufactured Product, B.P., E.P., J.P., U.S.P	9526-03
三水合醋酸钠	Merck	EMPROVE®bio, PhEur, BP, JP, USP	1.37012.1000
L-组氨酸	Merck	EMPROVE®exp, PhEur, USP, JP	1.04352.1000
一水合L-组氨酸盐 酸盐	Merck	EMPROVE®exp, PhEur, BP, JP	1.04354.0500
一水合柠檬酸	Merck	EMPROVE®exp, Ph Eur, BP, JP, USP.	1.00242.5000
柠檬酸钠	Merck	EMPROVE®exp, Ph Eur, BP, JP, USP.	1.06446.1000
6N盐酸	J.T Baker	GMP manufactured Product	0327-02
聚山梨酯80	NOF	USP, NF, EP, JP	HX2
聚山梨酯20	Croda	Super Refined™ USP, NF, PhEur, JP	SR40606
蔗糖	Pfanstiehl	high purity, low endotoxin, NF,EP,JP,ChP	36583A
氯化钠	Merck	EMPROVE®exp, Ph Eur, BP, JP, USP. low in endotoxins suitable for use as excipient	1.16224

海藻糖	Pfanstiehl	high purity, low endotoxin, NF,EP,JP,ChP	T-104-4
山梨醇	Merck	EMPROVE [®] exp, Ph Eur, BP, JP, NF	1.11597.9028
甘露醇	Merck	EMPROVE [®] APIPh Eur, BP, JP, USP	1.05303.5000
L-脯氨酸	Merck	EMPROVE [®] exp, Ph Eur, USP	1.07430.1000
L-精氨酸盐酸盐	Merck	EMPROVE [®] exp, Ph Eur, BP, JP	1.01544.1000

本发明中涉及的方法步骤如下:

1. 通用缓冲液制备方法: 所有缓冲液的制备均使用特定的酸性和碱性离子对。准确称取酸性, 碱性离子对的辅料, 加入约为目标缓冲液体积的 60% 的 Milli-Q 水, 混合均匀后, 测定溶液的 pH。如果 pH 值偏离目标值, 需使用相应的离子对调节 pH。然后将溶液用 Milli-Q 水稀释至目标重量或目标体积。最后测定溶液的电导率, 渗透压和 pH 以进行验证。

2. 样品制备方法: 用透析法将 DS 缓冲液置换到目标制剂处方中, 或者直接将高浓度辅料、表面活性剂加入高浓度 DS 中, 然后将 DS 稀释至目标浓度。透析方法根据使用的耗材可以分为以下两种: (1) 如果目标制剂的处方与 DS 中的缓冲液不同, 则使用透析方法将 DS 缓冲液置换为目标制剂处方(表面活性剂不可通过透析方法加入)。将样品装入 SnakeSkin[®]透析袋, 密封后, 放入体积大约是样品量 100 到 200 倍的缓冲液中。透析进行 3 次, 持续时间分别为 4 小时, 4 小时和过夜, 搅拌速度为 200 rpm。然后移取适量的表面活性剂和其他辅料储备液加入样品溶液中, 并将样品溶液稀释至目标浓度。(2) 还可使用 Slide-A-Lyzer 透析卡进行透析。使用带针注射器将 3- 12ml 样品装入透析卡内, 浸入 100 到 200 倍的目标缓冲液中, 在室温下, 以 300 转/分搅拌将透析卡持续透析三次, 时间分别为 4 小时, 4 小时和过夜。

3. 外观: 通过 YB-2 澄明度检测仪检查黑色和白色背景的外观。报告澄清度, 颜色和可见颗粒。

4. pH: 样品 pH 通过安装有 Inlab[®] Micro-Pro-ISM 电极的 Seven Compact pH 计测量样品 pH。在使用前校准 pH 计。

5. 蛋白浓度: 通过 Nano Drop 2000 分光光度计在 280nm 处的吸光度测定蛋白质浓度。在整个研究中使用的消光系数 (E1%) 为 1.422 L/g/cm。每个样品在 2.0 μ L 的加载体积下测量两次, 报告平均浓度。

6. 动态光散射仪 (DLS): 通过 DLS 使用以下测量条件测定蛋白质大小分布: 采集时间: 5s, 每次测量采集: 20 次, 温度: 25 $^{\circ}$ C。

6.1. 利用 DLS 测定 k_D 值: 将样品用相应的缓冲液稀释至浓度为 1、2、4、8、12、16、20 mg/mL, 利用 DLS 对其 k_D 值进行分析, 采集时间: 5s, 每次测量采集: 20 次, 温度: 25 $^{\circ}$ C。

6.2. 利用 DLS 测定粘度: 将待测样品与直径为 100nm 的标准粒子混合, 标准粒子的终浓度为 1%, 利用 DLS 测得标准粒子的表观粒径, 采集时间: 5s, 每次测量采集: 20 次, 温度: 25 $^{\circ}$ C, 并采集的数据经 DYNAMICS 软件进行分析计算出体系的粘度。

6.3. 利用 DLS 测定 T_{onset} 值: T_{onset} 测定的是蛋白在升温过程中发生构型变化或聚集而使得粒径发生变化时的转变温度。将样品用相应缓冲液稀释至 4 mg/mL, 取 100 μL 加入 96 孔板, 3000 rpm 离心 5 min, 加入 10 μL 硅油覆盖在样品上, 3000 rpm 离心 5 min。仪器在 25~80°C 范围内按照 1°C/min 进行线性升温, 同时单个样品测定 8 次, 每次采集 3 s。收集粒径和温度数据, 绘制曲线, 用仪器官方软件提供的线性相交功能可计算得到样品的 T_{onset} 。

7. 体积排阻色谱 (SEC): 蛋白聚集情况使用 Waters H Class 超高效液相色谱仪和 Waters BEH Protein SEC 柱 (150 \times 4.6 mm, 1.7 μm) 通过 SEC 方法测定。流动相为 50 mM 磷酸钠缓冲液, 300 mM NaCl, pH 6.8 \pm 0.1。流速为 0.4 mL/min。将样品稀释至 2 mg/mL, 检测体积 10 μL , 检测波长为 280nm。

8. 阳离子交换色谱 (CEX): 蛋白的电荷异质性通过 CEX-HPLC 方法进行测定。液相系统为 Agilent 1260 Infinity II, 色谱柱为 Thermo Propac WCX-10 BioLC column (4 \times 250 mm, 10 μm)。样品混合均匀后, 离心并转移上清液, 然后用流动相 A 稀释至 2.0 mg/mL。色谱条件如下表 10 所示。

表 10 阳离子色谱运行条件

类别	参数		
波长	280 nm		
柱温	30 \pm 1 °C		
流速	0.6 mL/min		
进样量	20 μL		
流动相 A	0.5 \times CX-1 pH 梯度溶液 A pH 5.5 \pm 0.2		
流动相 B	1 \times CX-1 pH 梯度溶液 B, 20 mM NaCl pH 10.1 \pm 0.2		
梯度	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00	90	10
	40.00	50	50
	40.10	0	100
	45.00	0	100
	45.10	90	10
55.00	90	10	

9. 非还原毛细管电泳 (NR-CE-SDS): 蛋白碎片情况通过 NR-CE-SDS 方法进行测定。将标准品或供试样品用磷酸-柠檬酸缓冲液稀释至 4 mg/mL, 然后取 25 μL 与 75 μL SDS 样品缓冲液和 5 μL NEM (100 mM N-乙基马来酰亚胺) 涡旋混合进行变性处理。变性的样品经离心后, 在 70 \pm 2 °C 下孵育 10 \pm 2 min, 在室温下冷却, 然后再次离心。使用 SDS 分离凝胶试剂盒和未涂层的熔融石英毛细管在 PA800 plus 上进行分离。使用高速分离模式, 毛细管的有效分离长度 10 cm。

10. 蛋白溶液浊度测试 (OD405): 通过 Envision 多功能微孔板检测仪对样品浊度进行检测。以缓冲液为空白对照, 测得样品与空白对照的差值为样品 405nm 的 OD 值。

11. 微流成像系统 (MFI): 样品中的亚可见微粒数量是通过 Protein Simple 的 MFI 5200 进行测定。样品无需稀释, 直接用移液枪取 1 mL 进样。报告每毫升样品中粒径分别在 $\geq 2 \mu\text{m}$, $\geq 10 \mu\text{m}$ 和 $\geq 25 \mu\text{m}$ 范围内的颗粒数。

12. 全柱成像毛细管等电聚焦电泳法 (icIEF): 样品通过和适当的包含有 pI 标记物和两性电解质混合物混匀后通过自动进样器进入到 iCE3 系统的 FC-coated 毛细管中。经过高电压分离步骤后, 蛋白的不同电荷异构体迁移到各自的等电点位置, 然后该分离后确定位置经 UV 检测器捕获 (通过全柱检测的 CCD 相机在 UV280nm 处采集的 UV 吸收图谱)。使用 iCE 系统软件, 通过样品出峰和相应的 pI 标记物的聚焦位置校准样品出峰的等电点, 后续数据分析在 Empower 软件中执行。色谱条件如下表 11 所示。

表 11 色谱运行条件

类别	参数
自动进样器温度	15°C
聚焦电压及时间	聚焦第一阶段: 1500 伏, 1 分钟
聚焦电压及时间	聚焦第二阶段: 3000 伏, 8 分钟
进样时间	进样时间可根据 TTM 的测试结果更改

13. 结合活性: 本方法使用抗 MASP-2 抗体 C4 活化抑制测定法, 实验中包被物为甘露聚糖, 检测抗体为 Complement C4c Antibody (HRP), 酶反应的底物为 TMB。将甘露聚糖包被吸附在 ELISA 固相载体吸附板上, 洗涤封闭后加入供试品和人血清补体混合物与之结合, 其中样品浓度越高其抑制血清中 MASP-2 裂解 C4 的效应越强, C4b 含量就越低, 则剪切得到的 C4c 越少。待孵育后洗涤, 加入检测抗体, 再进行孵育后洗涤除去未结合的检测抗体, 加入底物显色, 最后加入反应终止液, 在酶标仪上读取吸光值, 其检测波长为 450nm/650nm。以抗 MASP-2 抗体蛋白浓度的 log 值为横坐标, OD_{450nm-650nm} 值为纵坐标进行四参数拟合, 获得样品与标准品的 IC₅₀ 值。最终结果以标准品 IC₅₀ 值除以样品 IC₅₀ 值的相对活性进行汇报。

实施例 16: 辅料筛选实验

1. 实验设计

样品处方信息, 稳定性实验放置条件和检测方法如表格 12 所示。UFD 样品通过透析置换为目标处方的缓冲液中, 然后用相应的辅料储备液稀释至 30 mg/mL, 最后用 0.22 μm PVDF 膜过滤制备得到。

表 12 辅料筛选实验设计方案

处方	蛋白含量	辅料	缓冲体系	稳定性条件和检测项
F1(Arg)	30 mg/mL	150mM 精氨酸 (Arg)	20 mM Acetate, pH 5.5, 0.05% PS 80	T0: 外观, 蛋白含量, pH; OD405, DLS; SEC, NR CE-SDS, CEX; MFI 40°C (3,7,14 天): 蛋白含量, OD405, pH; DLS; SEC, NR CE-SDS, CEX 冻融 (1,3,5 次): 蛋白含量, OD405, pH, DLS; MFI 搅拌 (100 rpm 2,6 小时): 外观, 蛋白含量, pH; OD405, DLS; CEX 振摇 (1,3,5 天): 外观, 蛋白含量, OD405, CEX, NR CE-SDS
F2 (NaCl)		150mM 氯化钠 (NaCl)		
F3 (Sor)		5% 山梨醇(Sor)		
F4 (Suc)		9% 蔗糖(Suc)		
F5 (Tre)		9% 海藻糖 (Tre)		

2. 实验

2.1. 高温 40°C 实验结果

在 40°C 下放置 14 天后, 5 个处方的粒径、浓度、pH 没有明显差异; 纯度方面, 所有处方的纯度均发生下降, 其中 F2 (NaCl)和 F3 (Sor)的 SEC 主峰最多, F3 (Sor)的 CEX 主峰下降最多, 具体降解趋势如图 24, 图 25, 图 26 所示。

2.2. 振摇实验结果

辅料筛选中各处方在振摇条件下的 CEX 结果如图 27 所示, 振摇 1 天, 3 天, 5 天后, 5 个处方的外观、浓度、OD405 和纯度都没有发生明显变化。

2.3. 搅拌实验结果

5 个处方的样品外观均由乳光变为浑浊, 但 F4 (Suc)在搅拌 2 小时后依然保持乳光状态, 而其他处方在搅拌 2 小时后已变浑浊。除 F1(Arg)外, 其余处方的 OD405 均增加。所有处方的浓度和 pH 无明显变化。搅拌 2 小时, 6 小时后, 5 个处方的 SEC 纯度都没有发生明显变化。辅料筛选中各处方在搅拌条件下的 CEX、NR CE-SDS 结果如图 28、图 29 所示。

2.4. 冻融实验结果

经 5 轮冻融后, 5 个处方的样品浓度, 粒径, OD405 和 pH 均没有明显变化。不溶性微粒方面, F2 (NaCl)不溶性微粒浓度呈明显增加趋势。辅料筛选中各处方在冻融条件下的 MFI 结果如表格 13 所示。

表 13 MFI 结果_冻融

处方	2-10 μm				10-25 μm				$\geq 25 \mu\text{m}$			
	T0	1 次	3 次	5 次	T0	1 次	3 次	5 次	T0	1 次	3 次	5 次
F1(Arg)	4.5	11.3	15.9	19.3	46	4433	3157	3092	8	11	8	8
F2 (NaCl)	293.1	218.9	364.5	440.1	351.6	6158.8	3718.7	3230.3	0	34.4	4.2	15

F3 (Sor)	3.4	0.5	0.9	1.5	250	4	23	665	12 7	0	4	31
F4 (Suc)	2.8	0.5	2.0	187. 3	8	0	69	3719 6	0	0	0	425 2
F5 (Tre)	1.1	0.2	0.5	1.7	27	0	8	76	4	0	0	8

总结

对于 F2 (NaCl) 和 F3 (Sor) 来说, 40°C 条件下 SEC、CEX 主峰下降程度较其他处方更大, 明显劣于其他处方, 因此排除上述两种作为辅料。总体来看, 精氨酸、蔗糖和海藻糖之间无明显差异, 均可满足试验要求, 综合成本和辅料在生物制剂上应用的广泛性考虑, 因此选择蔗糖 F4 (Suc) 进入下一步实验。

实施例 17: 表面活性剂筛选实验

1. 实验设计

样品处方信息, 稳定性实验放置条件和检测方法如表格 14 所示。UFD 样品用相应的辅料储备液稀释至 50 mg/mL, 最后用 0.22 μm PVDF 膜过滤制备得到。分别取 1 mL 样品至 2R 西林瓶以进行 40°C 试验, 取 2 mL 样品至 6R 西林瓶中以进行搅拌试验, 2 mL 样品至 2R 西林瓶中进行振摇试验。

表 14 表面活性剂筛选实验方案设计

制剂处方	蛋白含量	表面活性剂	缓冲体系	稳定性条件和检测项
F6 (T2)	30 mg/mL	0.025% 聚山梨酯 80 (PS80)	20 mM Acetate pH 5.5, 9% 蔗糖	T0: 外观, 蛋白含量, pH; OD405, DLS; SEC, NR CE-SDS, CEX 40°C (3,7,14 天): 外观, 蛋白含量, pH, OD405 DLS; SEC, NR CE-SDS, CEX 搅拌 (100 rpm 2,6 小时): 外观, 蛋白含 量, pH; OD405, DLS; NR CE-SDS, CEX 振摇 (200rpm 1,3,5 天): 外观, 蛋白含 量, OD405, CEX, NR CE-SDS
F7 (T5)		0.05% 聚山梨酯 80 (PS80)		
F8 (T10)		0.1% 聚山梨酯 80 (PS80)		
F9 (W2)		0.025% 聚山梨酯 20 (PS20)		
F10 (W5)		0.05% 聚山梨酯 20 (PS20)		
F11 (W10)		0.1% 聚山梨酯 20 (PS20)		

2. 实验

2.1. 高温 40°C 实验结果

(1) 外观、粒径、Conc., pH 和 OD405

如表格 15 所示, 6 个处方在经 40°C 处理后外观、粒径、Conc., pH 和 OD405 均无变化。

表 15 表面活性剂筛选实验的外观, 粒径, 浓度和 OD405_高温实验结果

处方	外观		浓度 (mg/ml)		OD405		PH		粒径 (nm)	
	T0	14 天	T0	14 天	T0	14 天	T0	14 天	T0	14 天
F6 (T2)	SOC	SOC	31.5	31.6	0.07	0.07	5.7	5.6	7.7	8.0
F7(T5)	SOC	SOC	31.4	31.6	0.07	0.07	5.7	5.6	7.8	8.1
F8 (T10)	SOC	SOC	31.6	31.8	0.07	0.07	5.7	5.6	7.7	8.1
F9 (W2)	SOC	SOC	31.5	31.8	0.07	0.08	5.7	5.6	7.8	8.8
F10 (W5)	SOC	SOC	31.5	31.6	0.07	0.08	5.7	5.6	7.7	8.0
F11(W10)	SOC	SOC	31.7	31.6	0.07	0.08	5.7	5.6	7.7	8.2

SOC=轻微乳光

(2) SEC

如表 16 和图 30 所示, 经 40°C 处理后所有样品的 SEC 主峰略微下降, 但 6 组处方之间无明显区别。

表 16 表面活性剂筛选实验 SEC 结果_高温实验

处方	HMW%				MP%				LMW%			
	T0	3 天	7 天	14 天	T0	3 天	7 天	14 天	T0	3 天	7 天	14 天
F6 (T2)	1.0	1.6	1.9	2.2	98.6	98.3	97.9	97.6	0.4	0.2	0.2	0.2
F7(T5)	1.0	1.6	1.9	2.3	98.6	98.2	97.9	97.5	0.5	0.2	0.1	0.2
F8 (T10)	0.9	1.6	1.9	2.2	98.5	98.2	97.9	97.6	0.6	0.1	0.1	0.2
F9 (W2)	1.0	1.6	1.9	2.2	98.7	98.3	98.0	97.7	0.4	0.1	0.1	0.2
F10 (W5)	1.0	1.6	1.9	2.2	98.6	98.2	97.9	97.5	0.4	0.2	0.2	0.2
F11(W10)	1.0	1.6	1.9	2.3	98.6	98.2	98.0	97.6	0.4	0.1	0.1	0.2

(3) NR CE-SDS

如表格 17 所示, 经 40°C 处理后所有处方的 NR CE-SDS MP%均发生下降, 但变化幅度不大, 均在可接受范围。

表 17 表面活性剂筛选实验 NR CE-SDS 结果_高温实验

处方	LMW%				MP%			
	T0	3D	7D	14D	T0	3D	7D	14D
F6 (T2)	1.7	1.8	2.1	2.5	98.0	97.4	97.1	96.4
F7(T5)	1.5	1.8	2.0	2.5	98.3	97.6	97.2	96.3
F8 (T10)	1.7	1.9	2.0	2.4	98.1	97.3	97.2	96.5
F9 (W2)	1.6	1.9	2.0	2.5	98.1	97.3	97.2	96.3

F10 (W5)	1.7	1.9	2.0	2.4	98.0	97.4	97.2	96.3
F11(W10)	1.6	1.9	2.1	2.4	98.0	97.4	97.1	96.5

(4) CEX

如表格 18 所示，经 40°C 处理后，所有处方的主峰 MP%均发生了中等程度的下降，但均在可接受范围，各处方的 CEX 无显著差异。

表 18 CEX 结果_高温实验

处方	酸性峰%				MP%				碱性峰%			
	T0	3D	7D	14 D	T0	3D	7D	14 D	T0	3D	7D	14 D
F6 (T2)	23.7	21.7	24.0	28.5	62.7	63.4	60.7	56.2	13.6	14.9	15.3	15.3
F7(T5)	23.6	22.2	24.0	29.1	62.8	63.0	60.7	55.5	13.6	14.9	15.2	15.4
F8 (T10)	23.9	21.9	24.1	29.0	62.5	63.1	60.7	55.7	13.6	15.0	15.2	15.3
F9 (W2)	23.7	21.9	24.1	28.7	62.7	63.2	60.8	56.0	13.7	14.9	15.1	15.3
F10 (W5)	23.7	22.0	24.2	29.1	62.7	63.1	60.5	55.7	13.6	14.9	15.3	15.2
F11(W10)	23.7	24.8	24.1	28.6	62.7	60.6	60.8	56.0	13.6	14.6	15.2	15.4

2.2. 搅拌实验结果

表面活性剂筛选中各处方在 100 rpm 搅拌条件下的稳定性结果如表格 19、图 31、图 32 所示。经 100 rpm 搅拌 6 小时后，F6(T2)，F7 (T5)，F9 (W2)和 F10 (W5)的外观由乳光变为浑浊，所有处方的 OD405 均升高，浓度和 pH 无明显变化。搅拌 2 小时，6 小时后，6 个处方的纯度都没有发生明显变化。

表 19 外观、浓度、OD405、PH、粒径结果_搅拌实验

处方	外观			浓度 (mg/ml)			OD405			PH			粒径 (nm)		
	T0	2H	6H	T0	2H	6H	T0	2H	6H	T0	2H	6H	T0	2H	6H
F6 (T2)	SO C	SO C	Turbid	31.5	31.6	31.7	0.07	0.09	0.09	5.7	N T	5.6	7.7	8.2	8.1
F7(T5)	SO C	SO C	Turbid	31.4	31.6	31.6	0.07	0.09	0.15	5.7	N T	5.6	7.8	7.8	6.0
F8 (T10)	SO C	SO C	SOC	31.6	31.6	31.7	0.07	0.11	0.08	5.7	N T	5.6	7.7	8.9	7.7
F9 (W2)	SO C	SO C	Turbid	31.5	31.6	31.5	0.07	0.08	0.12	5.7	N T	5.6	7.8	7.9	8.0

F10 (W5)	SO C	SO C	Turbid	31.5	31.6	31.9	0.07	0.08	0.13	5.7	N T	5.6	7.7	8.7	8.1
F11(W10)	SO C	SO C	SOC	31.7	31.7	31.5	0.07	0.08	0.09	5.7	N T	5.6	7.7	7.9	8.1

SOC=轻微乳光、Turbid=浑浊

2.3. 振摇实验结果

(1) 外观、浓度、OD405

如表格 20 所示，经 200 rpm 振摇 5 天后，各处方的外观、浓度和 OD405 无明显变化。

表 20 外观、浓度、OD405 结果_振摇实验

处方	外观				浓度 (mg/ml)				OD405			
	T0	1D	3D	5D	T0	1D	3D	5D	T0	1D	3D	5D
F6 (T2)	SO C	SOC	SOC	SOC	31.5	31.6	31.5	31.7	0.07	0.08	0.07	0.07
F7(T5)	SO C	SOC	SOC	SOC	31.4	31.7	31.5	31.6	0.07	0.08	0.07	0.07
F8 (T10)	SO C	SOC	SOC	SOC	31.6	31.7	31.6	31.7	0.07	0.08	0.07	0.07
F9 (W2)	SO C	SOC	SOC	SOC	31.5	31.8	31.7	31.6	0.07	0.07	0.07	0.08
F10 (W5)	SO C	SOC	SOC	SOC	31.5	31.6	31.5	31.6	0.07	0.08	0.08	0.07
F11(W10)	SO C	SOC	SOC	SOC	31.7	31.5	31.6	31.5	0.07	0.08	0.07	0.07

SOC=轻微乳光

(2) NR CE-SDS

如表格 21 所示，经振摇处理后，所有处方的 NR CE-SDS 主峰变化无明显区别。

表 21 NR CE-SDS 结果_振摇实验

处方	LMW%				MP%			
	T0	1D	3D	5D	T0	1D	3D	5D
F6 (T2)	1.7	2.0	1.9	1.9	98.0	97.7	97.7	97.6
F7(T5)	1.5	1.9	1.8	1.8	98.3	97.8	97.9	97.7
F8 (T10)	1.7	2.1	1.8	2.1	98.1	97.6	97.8	97.4
F9 (W2)	1.6	2.0	1.8	2.0	98.1	97.7	97.9	97.5
F10 (W5)	1.7	2.1	1.8	2.1	98.0	97.6	97.8	97.5
F11(W10)	1.6	1.9	1.9	2.0	98.0	97.8	97.7	97.5

(3) CEX

如表格 22 所示，经振摇处理后，所有处方的 CEX 主峰无明显变化。

表 22 CEX 结果_振摇实验

处方	酸性峰%	MP%	碱性峰%
----	------	-----	------

	T0	3D	7D	14 D	T0	3D	7D	14 D	T0	3D	7D	14 D
F6 (T2)	23.7	21.0	21.1	21.3	62.7	64.6	64.5	64.2	13.6	14.4	14.4	14.5
F7(T5)	23.6	21.0	21.1	21.0	62.8	64.7	64.5	64.5	13.6	14.3	14.4	14.4
F8 (T10)	23.9	21.2	21.2	21.0	62.5	64.4	64.3	64.2	13.6	14.4	14.5	14.8
F9 (W2)	23.7	20.7	20.9	21.0	62.7	64.9	64.8	64.5	13.7	14.4	14.4	14.5
F10 (W5)	23.7	21.1	21.2	21.0	62.7	64.5	64.1	64.5	13.6	14.4	14.7	14.5
F11(W10)	23.7	21.5	20.7	21.3	62.7	64.1	64.9	64.1	13.6	14.5	14.4	14.6

3. 总结

40°C 条件下，各个处方的外观、OD405 和 DLS 等结果均无明显变化，所有处方的 SEC 有略微降低，NR CE-SDS 和 CEX 主峰有中等程度定的降低，处方之间的差异较小。

搅拌条件下，各处方的浓度无明显变化，但 F6 (T2)，F7 (T5)，F8 (W2)和 F10(W5)的外观由乳光变为浑浊，F7 (T5)，F9 (W2)和 F10(W5)的 OD405 上升，所有处方的 DLS 粒径和 PDI 均有增加，纯度无明显变化。

振摇条件下，各个处方的外观和 DLS 等结果均无明显变化，所有处方的纯度无明显变化，处方之间没有差异。

在表面活性剂筛选中，聚山梨酯 80 和聚山梨酯 20 之间无明显差别，所有处方均对于振摇应力有一定的抗性，均满足实验要求。综合成本考虑，选择聚山梨酯 80 作为表面活性剂进行接下来的试验。

实施例 18: pH 筛选实验

1. 实验设计

样品处方信息和检测方法如表 23 所示。UFDF 样品通过透析置换为目标处方的缓冲液中，然后用相应的辅料储备液稀释至 30 mg/mL，最后用 0.22 μm PVDF 膜过滤制备得到。样品制备完成后对其外观，浓度，渗透压，粘度， k_D ， T_{onset} 进行测定。

表 23 pH 筛选实验设计方案

处方	蛋白含量	缓冲体系		表面活性剂	稳定性条件和检测项
F12	30 mg/mL	20mM 醋酸 (Ace)	4.5	0.05% 聚山 梨酯 80	T0: 蛋白含量, 外观, OD405, pH, DLS, SEC, CEX, NR CE-SDS 冻融 (-70°C~RT 室温, 3/5 循环): 蛋 白含量, pH, OD405, DLS, MFI 振摇 (200 rpm, 1/3/5 天): 蛋白
F13			5.0		
F14			5.5		
F15		5.0			

F16		20mM 组氨酸 (His)	5.5		含量, 外观, pH, OD405, CEX, NR CE-SDS, 高温 40°C (3/7/14 天): 蛋白含量, OD405, pH, DLS, SEC, CEX, NR CE-SDS
F17			6.0		
F18		20mM 柠檬酸 (Cit)	5.5		
F19			6.0		
F20			6.5		

2. 实验

2.1. 冻融实验

(1) 浓度, pH, 粒径和 OD405 结果

如表格 24 所示, 经 5 次冻融后, F18 (Cit5.5), F19 (Cit6.0)和 F20 (Cit6.5)的 OD405 呈增加趋势, 其余处方的 OD405 没有明显变化。9 个处方的样品浓度和 pH 均没有明显变化。F18 (Cit5.5), F19 (Cit6.0)和 F20 (Cit6.5)的样品粒径较大, 冻融后样品粒径无明显变化。

表 24 外观, 浓度, pH 和 OD405 结果_冻融

处方	浓度(mg/mL)		OD405		pH		粒径 (nm)	
	T0	5 次	T0	5 次	T0	5 次	T0	5 次
F12 (Ace4.5)	29.5	29.7	0.062	0.065	4.7	4.8	2.8	2.8
F13 (Ace5.0)	30.7	31.8	0.067	0.071	5.2	5.2	4.5	4.6
F14 (Ace5.5)	30.5	31.6	0.073	0.077	5.7	5.6	6.2	4.6
F15 (His5.0)	30.1	30.5	0.071	0.076	5.1	5.1	5.8	5.8
F16 (His5.5)	30.5	31.1	0.076	0.078	5.6	5.6	6.8	7.6
F17 (His6.0)	30.2	31.0	0.072	0.077	6.1	6.1	6.7	7.5
F18 (Cit5.5)	30.4	31.1	0.063	0.090	5.6	5.5	12.0	11.3
F19 (Cit6.0)	30.7	30.5	0.079	0.086	6.0	5.9	10.0	9.9
F20 (Cit6.5)	30.2	30.6	0.075	0.080	6.5	6.3	8.9	9.0

(2) MFI 结果

如表格 25 所示, T0 时, 在 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒浓度方面, 所有处方均小于 10 个/mL; 在 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒方面, 所有处方均小于 100 个/mL。经过冻融后, F19 (Cit6.0)中 $\geq 2 \mu\text{m}$ 和 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒有明显增加趋势, 其余处方之间没有观察到明显的差异。

表 25 MFI 结果_冻融

处方	2-10 μm	10-25 μm	$\geq 25 \mu\text{m}$
----	--------------------	---------------------	-----------------------

	T0	1次	3次	5次	T0	1次	3次	5次	T0	1次	3次	5次
F12 (Ace4.5)	726	1211	344	1429	19	15	4	176	4	4	0	11
F13 (Ace5.0)	194 9	589	925	1429	57	19	19	76	0	0	11	8
F14 (Ace5.5)	220 9	967	1143	3020	42	15	65	456	0	0	4	13 9
F15 (His5.0)	982	405	940	2713	4	27	38	283	0	0	4	34
F16 (His5.5)	715	822	6699	772	0	8	91 7	69	0	4	23	4
F17 (His6.0)	507 1	428	459	482	57	8	11	15	0	0	8	0
F18 (Cit5.5)	486 5	699	688	1204	19	73	15	80	0	4	8	0
F19 (Cit6.0)	389 4	1295 1	1368 1	1256 9	54	159 7	95 9	153 6	4	8	19	19
F20 (Cit6.5)	145 2	5385	2281	1093 7	50	46	8	696	0	8	0	19

2.2. 振摇实验

(1) 外观、浓度，pH和OD405结果

如表 26 所示，T0 时，所有样品均呈有乳光，且均未发现可见异物，蛋白浓度和 pH 值均符合要求。经 200 rpm 振摇 5 天后，F18 (Cit5.5) 外观变为浑浊，F18 (Cit5.5)，F19 (Cit6.0) 和 F20 (Cit6.5) 的 OD405 呈增加趋势，其余处方的外观和 OD405 没有明显变化。9 个处方的样品浓度和 pH 均没有明显变化。

表 26 外观，浓度，pH 和 OD405 结果_振摇

处方	外观		浓度(mg/mL)		OD405		pH	
	T0	5天	T0	5天	T0	5天	T0	5天
F12 (Ace4.5)	SOC	SOC	29.5	29.3	0.062	0.062	4.7	4.6
F13 (Ace5.0)	SOC	SOC	30.7	30.7	0.067	0.067	5.2	5.0
F14 (Ace5.5)	SOC	SOC	30.5	30.5	0.073	0.073	5.7	5.5
F15 (His5.0)	SOC	SOC	30.1	30.2	0.071	0.071	5.1	5.0
F16 (His5.5)	SOC	SOC	30.5	30.4	0.076	0.075	5.6	5.5
F17 (His6.0)	SOC	SOC	30.2	30.3	0.072	0.075	6.1	6.1
F18 (Cit5.5)	SOC	Turbid	30.4	30.3	0.063	0.074	5.6	5.4
F19 (Cit6.0)	SOC	SOC	30.7	30.7	0.079	0.086	6.0	5.9
F20 (Cit6.5)	SOC	SOC	30.2	30.2	0.075	0.080	6.5	6.4

SOC=轻微乳光

Turbid=浑浊

(2) NR CE-SDS 和 CEX 结果

如表 27 和表 28 所示，所有处方的 NR CE-SDS 和 CEX 主峰无变化。

表 27 NR CE-SDS 结果_振摇

处方	LMW%				MP%			
	T0	1天	3天	5天	T0	1天	3天	5天
F12 (Ace4.5)	1.6	1.8	1.6	1.8	98.1	98.0	98.1	97.8
F13 (Ace5.0)	1.6	1.7	1.6	1.8	98.1	97.9	98.0	97.7
F14 (Ace5.5)	1.6	1.9	1.6	1.8	98.1	97.7	97.8	97.7
F15 (His5.0)	1.5	1.8	1.6	1.8	98.2	98.0	98.0	97.8
F16 (His5.5)	1.5	1.9	1.6	1.8	98.2	97.7	98.0	97.8
F17 (His6.0)	1.6	1.8	1.5	1.9	98.0	97.9	98.1	97.6
F18 (Cit5.5)	2.2	1.9	1.7	1.9	97.6	97.7	98.0	97.8
F19 (Cit6.0)	1.5	1.9	1.6	1.9	98.1	97.7	97.8	97.5
F20 (Cit6.5)	1.6	2.0	1.7	1.8	98.1	97.5	97.7	97.5

表 28 CEX 结果_振摇

处方	酸性峰				主峰				碱性峰			
	T0	1D	3D	5D	T0	1D	3D	5D	T0	1D	3D	5D
F12 (Ace4.5)	23.8	21.1	21.4	21.6	62.4	64.2	63.4	63.5	13.9	14.8	15.2	14.9
F13 (Ace5.0)	23.7	21.0	21.2	21.2	62.4	64.4	64.1	64.1	13.9	14.6	14.7	14.7
F14 (Ace5.5)	23.3	20.8	20.9	20.7	63.0	64.6	64.6	64.6	13.7	14.6	14.5	14.7
F15 (His5.0)	21.5	20.4	20.7	20.7	64.7	65.1	64.7	64.5	13.8	14.5	14.7	14.8
F16 (His5.5)	21.9	21.1	20.8	20.8	64.4	64.5	64.6	64.5	13.7	14.4	14.5	14.7
F17 (His6.0)	22.1	21.1	20.7	21.1	64.2	64.4	65.0	64.4	13.7	14.5	14.3	14.5
F18 (Cit5.5)	23.4	20.7	20.6	21.0	62.9	64.7	64.7	64.4	13.7	14.6	14.6	14.6
F19 (Cit6.0)	23.3	20.9	21.1	21.2	63.1	64.6	64.3	64.2	13.6	14.5	14.6	14.6
F20 (Cit6.5)	23.5	21.0	20.8	21.3	62.9	64.6	64.7	64.2	13.6	14.4	14.5	14.5

2.3. 高温 40°C 实验

(1) 浓度, pH, 粒径和 OD405 结果

如表格 29 所示，在 40°C 下放置 14 天后，9 个处方的浓度、pH 和粒径没有明显差异。但 F18 (Cit5.5) 的 OD405 有一定程度的上升。

表 29 浓度, pH 和 OD405 结果_高温

处方	浓度(mg/mL)		OD405		pH		粒径 (nm)	
	T0	14天	T0	14天	T0	14天	T0	14天

F12 (Ace4.5)	29.5	29.5	0.062	0.064	4.7	4.7	2.8	2.8
F13 (Ace5.0)	30.7	30.8	0.067	0.070	5.2	5.1	4.5	4.6
F14 (Ace5.5)	30.5	30.4	0.073	0.076	5.7	5.5	6.2	7.2
F15 (His5.0)	30.1	30.3	0.071	0.073	5.1	5.0	5.8	6.2
F16 (His5.5)	30.5	30.5	0.076	0.072	5.6	5.5	6.8	7.3
F17 (His6.0)	30.2	30.3	0.072	0.080	6.1	6.0	6.7	7.5
F18 (Cit5.5)	30.4	30.6	0.063	0.097	5.6	5.5	12.0	8.0
F19 (Cit6.0)	30.7	30.5	0.079	0.090	6.0	5.9	10.0	9.6
F20 (Cit6.5)	30.2	30.2	0.075	0.084	6.5	6.4	8.9	9.2

(2) SEC 结果

如表格 30 和图 21 所示, 组氨酸处方中蛋白的 SEC HMW%含量总体较小, 醋酸处方和柠檬酸处方中蛋白的 SEC HMW%含量随着 pH 增加而增加, F14 (Ace5.5)的 SEC HMW%增加程度较大。

表 30 SEC 结果_高温

处方	HMW%				MP%				LMW%			
	T0	3天	7天	14天	T0	3天	7天	14天	T0	3天	7天	14天
F12 (Ace4.5)	0.6	0.9	1.2	1.5	99.0	98.9	98.7	98.3	0.4	0.1	0.2	0.2
F13 (Ace5.0)	0.8	1.4	1.7	2.1	98.8	98.5	98.1	97.7	0.4	0.1	0.2	0.2
F14 (Ace5.5)	1.1	2.1	2.6	3.1	98.5	97.7	97.3	96.6	0.4	0.2	0.1	0.2
F15 (His5.0)	0.8	1.4	1.6	2.0	98.8	98.5	98.2	97.8	0.4	0.2	0.2	0.2
F16 (His5.5)	0.9	1.5	1.7	2.2	98.7	98.4	98.1	97.6	0.4	0.2	0.2	0.2
F17 (His6.0)	1.1	1.6	1.9	2.5	98.5	98.2	98.0	97.3	0.4	0.2	0.2	0.2
F18 (Cit5.5)	1.2	1.3	2.3	2.9	98.4	98.5	97.6	96.9	0.4	0.2	0.1	0.2
F19 (Cit6.0)	1.4	2.3	2.6	2.9	98.2	97.5	97.3	96.9	0.4	0.2	0.2	0.2
F20 (Cit6.5)	1.7	2.7	3.0	3.2	97.9	97.0	96.9	96.6	0.4	0.3	0.2	0.2

(3) NR CE-SDS 结果

如表格 31 和图 22 所示, 高温 40℃下, 所有处方的 LMW%随着时间都有所增加, 但所有处

方结果均在可接受范围内。

表 31 NR CE-SDS 结果_高温

处方	LMW%				MP%			
	T0	3 天	7 天	14 天	T0	3 天	7 天	14 天
F12 (Ace4.5)	1.6	2.0	2.1	2.6	98.1	97.6	97.3	96.8
F13 (Ace5.0)	1.6	2.0	2.1	2.7	98.1	97.4	97.1	96.5
F14 (Ace5.5)	1.6	2.0	2.1	2.6	98.1	97.2	96.7	95.9
F15 (His5.0)	1.5	2.0	2.2	2.7	98.2	97.4	97.1	96.5
F16 (His5.5)	1.5	2.0	2.2	3.0	98.2	97.4	97.1	96.0
F17 (His6.0)	1.6	1.8	2.3	3.2	98.0	97.5	96.9	95.5
F18 (Cit5.5)	2.2	2.1	2.1	2.3	97.6	97.5	97.0	96.3
F19 (Cit6.0)	1.5	1.8	2.1	2.3	98.1	97.3	96.9	96.4
F20 (Cit6.5)	1.6	1.9	2.2	2.4	98.1	97.1	96.6	96.2

(4) CEX 结果

如表格 32 和图 23 所示, 所有处方结果均在可接受范围内, 其中 F17 (His6.0) 主峰变化程度最大, 其余处方的变化无显著性差异。

表 32 CEX 结果_高温

处方	酸性峰%				MP%				碱性峰%			
	T0	3 天	7 天	14 天	T0	3 天	7 天	14 天	T0	3 天	7 天	14 天
F12 (Ace4.5)	23.8	21.4	21.5	26.6	62.4	62.9	62.0	55.4	13.9	15.6	16.4	17.9
F13 (Ace5.0)	23.7	21.4	22.0	27.0	62.4	63.1	62.4	56.1	13.9	15.5	15.6	16.9
F14 (Ace5.5)	23.3	21.5	22.3	28.0	63.0	62.7	61.9	55.9	13.7	15.8	15.8	16.2
F15 (His5.0)	21.5	21.0	20.7	25.5	64.7	63.2	62.6	56.0	13.8	15.7	16.7	18.5
F16 (His5.5)	21.9	21.3	21.7	27.9	64.4	63.3	61.9	53.7	13.7	15.4	16.4	18.5
F17 (His6.0)	22.1	22.7	24.1	31.7	64.2	62.2	60.0	51.1	13.7	15.1	15.9	17.2
F18 (Cit5.5)	23.4	21.8	23.8	29.9	62.9	62.9	60.8	54.4	13.7	15.3	15.4	15.7
F19 (Cit6.0)	23.3	22.4	24.0	29.8	63.1	62.8	61.0	55.3	13.6	14.8	15.0	14.9
F20 (Cit6.5)	23.5	22.5	25.4	32.0	62.9	62.9	60.1	54.1	13.6	14.6	14.5	13.9

3. 总结

pH 筛选实验在 T0 时, F18 (Cit5.5), F19 (Cit6.0) 和 F20 (Cit6.5) 的粒径较大, 表明其结构更为松散; 振摇实验中 F18 (Cit5.5) 的外观由乳光变为浑浊, 劣于其他处方; 冻融实验中 F19 (Cit6.0)

和 F20 (Cit6.5)的不溶性微粒数量变化较大；在 40°C 条件下，F18 (Cit5.5)的 OD405 上升，F14 (Ace5.5)的 SEC 高聚体增加较多，F16 (His5.5)和 F17 (His6.0)的 CEX 主峰下降较多和 NR CE-SDS 低聚体增加较多。

总体来看，醋酸和组氨酸体系的稳定性更优，总体而言，在醋酸体系中的 pH 4.5 和 pH 5.0，组氨酸体系中的 pH 5.0 和 pH 5.5 对蛋白具有较好的稳定性。考虑到醋酸缓冲液体系在 pH 5.0，组氨酸体系在 pH 5.5 时的缓冲能力和稳健性较好，在工艺中 pH 调节时具有较好的操作空间，对偏离目标值的极端情况具有较好的风险控制。此外对于皮下注射的制剂而言，选用组氨酸的刺激更小，患者的耐受度更高。因此优选 F13 (Ace5.0)醋酸缓冲液 pH 5.0 和 F16 (His5.5)组氨酸缓冲液 pH 5.5 为优选缓冲体系。

实施例 19: 低浓度处方确认试验

1. 实验设计

样品处方信息和检测方法如表 33 所示。样品通过透析置换为目标处方的缓冲液中，然后用相应的辅料储备液稀释至 20 mg/mL，最后用 0.22 μ m PVDF 膜过滤制备得到。样品制备完成后对其外观，浓度，渗透压，粘度，kD，Tonset 进行测定。

表 33 处方设计方案

处方	蛋白含量	处方信息	稳定性条件	检测项
F21	20 mg/mL	10 mM Histidine, 8.6% 蔗糖, 0.05%, 聚山梨酯 80, pH 5.3	5°C(1/3 个月) 25°C(2/4/6 周, 3 个月) 40°C(2/4/6 周) -20°C(1/3 个月) -30°C(1/3 个月) 冻融 (-70°C~室温, 3/5 循环) 振摇 (200 rpm, 1/3/5 天) 高温 40°C (3/7/14 天)	目检, pH, 蛋白含量, 渗透压, 粘度, OD405, 粒径, MFI, SEC, NR-CE, R-CE, CEX, 生物学活性, PS80

2. 实验结果

2.1 外观，浓度，pH，粒径和 OD405 结果

如表格 34 所示，处方 F21 在经历搅拌、冻融、光照、振摇以及 5° C、25° C、40° C、-20° C、-30° C 条件的孵育之后，基本属性（外观、浓度、pH、生物学活性）均没有发生明显变化。对于粒径和 PD%结果，除 40° C 外的稳定性条件下均无明显差异；因为 40° C 对于蛋白制剂属于较为剧烈的应力条件，因此结果变化较为明显属于正常现象，具体应根据 SEC, NR-CE, CEX 的结果进行判断。

表 34 外观，浓度，pH 和 OD405 结果

稳定性条件	外观	浓度 (mg/mL)	OD405	pH	粒径 (nm)	PD%	生物学活性
T0	SOC	20.7	0.017	5.3	5.9	23.1	111
搅拌	2H	20.6	0.020	5.3	6.4	51.9	NT
	-20C	SOC	20.7	0.018	NT	6.1	

冻融 5循环	-30C	SOC	20.6	0.019		6.1	22.5	
	-70C	SOC	20.6	0.018		6.0	23.0	
光照	7D	SOC	20.6	0.018		5.7	15.2	102
振摇	10D	SOC	20.7	0.018		5.8	21.8	NT
25° C	2W	SOC	20.5	0.020		6.1	19.5	
	4W	SOC	20.8	0.019	5.3	6.3	27.9	
	6W	SOC	20.7	0.019	NT	6.2	40.1	
	3M	SOC	20.6	0.018	5.3	6.7	47.2	
40° C	2W	SOC	20.4	0.023	NT	7.1	56.0	96
	4W	SOC	20.8	0.023	5.3	11.2	Multimodal	
	4WI	SOC	20.7	0.022	5.3	12.7	Multimodal	93
	6W	SOC	20.7	0.032	NT	20.7	Multimodal	104
5° C	1M	SOC	20.6	0.018	5.3	5.7	11	NT
	3M	SOC	20.5	0.020	5.3	6.1	20.2	
-20° C	1M	SOC	20.6	0.019	5.3	5.6	8	
	3M	SOC	20.5	0.017	5.3	5.7	9.0	
-30° C	1M	SOC	20.6	0.017	5.3	5.6	8.7	
	3M	SOC	20.5	0.016	5.3	5.6	8.6	

SOC=轻微乳光、Multimodal=多峰、NT=未检测

2.2 SEC, CEX, NR CE-SDS 结果

如表格 35 所示，处方 F21 在经历搅拌、冻融、光照、振摇以及 5° C、25° C、-20° C、-30° C 条件的孵育之后，SEC, CEX, NR CE 的结果均无明显变化。40° C 条件下，SEC、CEX 和 NR CE 主峰均发生了一定程度的下降，但并不影响生物学活性；在 40° C 下倒置 4 周的样品和正置相比，各检测项无明显差异，说明包材与蛋白制剂相容性良好。

表 15 SEC, CEX, NR CE-SDS 结果

稳定性条件		SEC			CEX			NR CE	
		HMW%	MP%	LMW%	酸性峰%	主峰%	碱性峰%	MP%	LMW%
T0		0.6	99.4	ND	24.0	73.1	2.9	98.0	1.7
搅拌	2H	0.6	99.4	ND	23.7	73.5	2.8	98.7	1.1
冻融 5 循环	- 20C	0.8	99.2	ND	22.3	74.3	3.4	98.6	1.4
	- 30C	0.8	99.2	ND	22.5	73.9	3.6	98.9	1.1
	- 70C	0.8	99.2	ND	22.0	74.8	3.2	98.7	1.3
光照	7D	0.9	99.1	ND	24.2	72.3	3.6	98.6	1.3
振摇	10D	0.7	99.3	ND	24.0	71.7	4.3	98.8	1.2
25° C	2W	0.8	99.2	ND	22.2	74.0	3.7	98.8	1.0
	4W	0.7	99.3	ND	24.1	72.4	3.6	98.2	1.6
	6W	0.7	99.3	ND	26.5	69.7	3.9	98.4	1.6
	3M	0.8	99.1	0.1	31.0	64.6	4.3	98.4	1.6

	6M	1.0	98.8	0.2	41.0	54.5	4.5	97.1	2.5
40° C	2W	0.9	98.8	0.3	34.5	60.3	5.2	97.0	2.6
	4W	1.1	98.2	0.7	49.5	45.7	4.8	93.0	6.3
	4WI	1.0	98.3	0.7	49.1	46.3	4.6	93.4	6.1
	6W	1.7	95.2	1.0	54.5	39.0	6.5	91.3	8.6
5° C	1M	0.7	99.3	ND	21.4	75.4	3.2	98.4	1.4
	3M	0.7	99.3	ND	24.4	71.3	4.2	98.9	1.1
	6M	0.7	99.3	ND	23.3	72.6	4.1	97.7	1.4
-20° C	1M	0.7	99.3	ND	22.3	74.1	3.6	98.3	1.5
	3M	0.7	99.3	ND	23.7	72.3	4.0	98.9	1.1
	6M	0.7	99.3	ND	22.5	73.1	4.4	98.4	1.3
-30° C	1M	0.7	99.3	ND	22.1	74.7	3.2	98.1	1.7
	3M	0.7	99.3	ND	22.6	73.4	4.0	99.1	0.9
	6M	0.7	99.3	ND	22.7	73.2	4.1	98.4	1.3

ND 表示未检出

3. 总结

低浓度处方确认实验的结果表明，最终处方 F21 在 5° C、25° C、-20° C、-30° C 条件下均能保持长时间的稳定，对冻融和振摇的耐受性较好，在光照和搅拌条件下不会发生变化，在 40° C 条件下会有一些的变化，因此该样品应该注意防止长时间高温放置。低浓度制剂开发经过了表面活性剂筛选，辅料筛选，pH 筛选和最终处方确认研究，得到最终低浓度制剂处方选定为 20 mg/mL 蛋白，10 mM 组氨酸盐，8.6% (w/v) 蔗糖，0.05% (w/v) 聚山梨酯 80，pH 为 5.3。

实施例 20: 高浓度实验

1. 实验设计

样品处方信息，稳定性实验放置条件和检测方法如表格 36 所示。UFDF 样品经超滤浓缩后用相应的辅料储备液稀释至 150 mg/mL，最后用 0.22 μm PVDF 膜过滤制备得到。取制备的样品分别进行 k_D ， T_{onset} 和粘度测定。

表 36 高浓度实验设计方案

处方	缓冲体系	PH	辅料种类	检测项
F22(A45)	10mM 醋酸 (Ace)	4.5	NA	k_D T_{onset} 渗透压
F23(A50)		5.0		
F24(A55)		5.5		
F25(H50)	10mM 组氨酸 (His)	5.0		
F26(H55)		5.5		
F27(H60)		6.0		
F28(SUC)	10mM 醋酸 (Ace)	5.0	5.8% 蔗糖 (Suc)	
F29 (PRO)			230mM 脯氨酸 (Pro)	

F30(ARG)			125mM 精氨酸 (Arg)	
----------	--	--	----------------------	--

2. 实验结果

表 37 kD 值, Tonset 和渗透压结果

处方	k_D (mL/g)	T_{onset} (°C)	渗透压 Osmo. (mOsm/kg)
F22 (A45)	107.0	70.5	NT (未检测)
F23(A50)	40.6	68.0	
F24 (A55)	13.2	68.1	
F25(H50)	21.1	61.7	
F26(H55)	9.3	63.4	
F27(H60)	6.5	64.9	
F28(SUC)	22.2	67.2	
F29 (PRO)	22.5	63.7	316
F30(ARG)	-9.8	58.3	276

(1) k_D 值结果

pH 为 4.5, 5.0, 5.5 的醋酸缓冲液和 pH 为 5.0, 5.5, 6.0 的组氨酸缓冲液 k_D 均为正值。在 pH 为 5.0 的 10 mM 醋酸缓冲液中, 辅料为 5.8% 蔗糖和 230 mM 脯氨酸的处方的 k_D 为正值, 辅料为 125 mM 精氨酸时为负值。 k_D 为正, 说明体系中蛋白分子之间的作用力为强净排斥力, 有利于蛋白的长期胶体稳定性, 当 k_D 为负值时, 说明蛋白分子之间的作用力为净吸引力, 不利于蛋白的长期胶体稳定性。

(2) T_{onset} 结果

T_{onset} 能预测蛋白的热稳定性。除 F29 (ARG) 精氨酸处方外, 各样品的 T_{onset} 值均大于 60°C, 表示在这些处方中, 蛋白有较好的热稳定性。

(3) 渗透压

根据渗透压结果可知, 125 mM 精氨酸和 5.8% 的蔗糖浓度较目标值低, 需要在后续实验中进行进一步调整。

3. 总结

通过在不同缓冲液和辅料中的一般性质研究, 10 mM Acetate (pH 4.5, pH 5.0, pH 5.5) 和 10mM Histidien (pH5.0, pH5.5 和 pH6.0) 的 k_D 为正值, T_{onset} 值均大于 60°C, 均满足试验要求。对于 3 种辅料而言, 精氨酸的 k_D 和 T_{onset} 均劣于蔗糖和脯氨酸。对皮下注射剂来说, 选用组氨酸的缓冲体系对注射刺激性更小, 且 pH 不宜过低, 因此综合来看, 优选 10 mM Acetate, pH 5.0, 10 mM Histidine, pH 5.0, 10 mM Histidine, pH 5.5, 搭配蔗糖或者脯氨酸进入下一步研究。

实施例 21: 6 处方研究和工艺比较实验

1. 实验设计

样品处方信息, 稳定性实验放置条件和检测方法如表格 38 所示。Fed-batch 的 UFDF 样品先行超滤浓缩至合适浓度, 然后用相应的辅料储备液稀释至 150 mg/mL, 最后用 0.22 μm PVDF 膜过滤制备得到。分别取 1 mL 样品至 2R 西林瓶以进行 25°C、40°C 和光照试验, 取 2 mL 样品至 6R 西林瓶中以进行搅拌试验, 2 mL 样品至 2R 西林瓶中进行振摇试验。

表 38 最佳 6 处方实验设计方案

处方	浓度	原液工艺	处方信息	稳定性条件
F31 (Ace50Suc)	150 mg/mL	Perfusion	10 mM Acetate pH5.0, 190 mM sucrose, 0.1% 聚山梨酯 80	T0 光照 (3D) 振摇 (10D) 25°C (2/4W) 40°C (2/4/6W)
F32 (His50Suc)			10 mM Histidine pH5.0, 190 mM sucrose, 0.1% 聚山梨酯 80	
F33 (His55Suc)			10 mM Histidine pH5.5, 190 mM sucrose, 0.1% 聚山梨酯 80	
F34 (Ace50Pro)			10 mM Acetate pH5.0, 230 mM proline, 0.1% 聚山梨酯 80	
F35 (His50Pro)			10 mM Histidine pH5.0, 230 mM proline, 0.1% 聚山梨酯 80	
F36 (His55Pro)			10 mM Histidine pH5.5, 230 mM proline, 0.1% 聚山梨酯 80	
F37 (FedBatch)			Fed-Batch	
检测项	T0: 外观, OD405, pH, 浓度, 渗透压, SEC, NR CE-SDS, CEX, 活性, 黏度 光照: 外观, OD405, 浓度, DLS, SEC, NR CE-SDS, CEX 振摇: 外观, OD405, 浓度, DLS, SEC, NR CE-SDS, CEX, MFI			

25°C: 外观, OD405, pH, 浓度, DLS, SEC, NR CE-SDS, CEX
40°C: 外观, OD405, pH, 浓度, DLS, SEC, NR CE-SDS, CEX, 活性

2. 实验

2.1. 高温 40°C 实验

(1) 外观, 粒径, 浓度, OD405 和 pH

如表格 39 所示, 所有处方的渗透压均在预设目标内 (250~350 mOsm/kg H₂O), 以蔗糖作为辅料的处方 (F31, F32, F33, F37) 相较于脯氨酸处方 (F34, F35, F36) 的粘度更高, 组氨酸处方与醋酸处方相比粘度更高。F34 (Ace50Pro), F35 (His50Pro) 和 F36 (Fed-Batch) 的 pH 比目标值略高, 需要在后续实验中进行调整。7 个处方在经 40°C 处理 4 周后外观、粒径浓度和 pH 均无变化, 但 F31 (Ace50Suc), F32 (His50Suc), F33 (His55Suc), F34 (Ace50Pro) 和 F36 (His55Pro) 的 OD405 略有上升。

表 39 外观, 粒径, 浓度, OD405 和 pH 结果_高温 40°C 实验

处方	渗透压 (mOsm /kg H ₂ O)	黏度 cP	外观		浓度		OD405		PH		粒径	
			T0	4W	T0	4W	T0	4W	T0	2W	T0	4W
F31 (Ace50 Suc)	262	18.7	SYC	SYC	146. 2	147. 1	0.22	0.27	5.1	5.2	2.9	3.3
F32 (His50 Suc)	306	29.2	SYC	SYC	147. 4	148. 6	0.22	0.26	5.1	5.1	3.5	5.1
F33 (His55 Suc)	311	28.2	SYC	SYC	145. 5	148. 5	0.23	0.27	5.4	5.4	3.6	6.0
F34 (Ace50 Pro)	300	10.9	SYC	SYC	148. 4	148. 3	0.23	0.27	5.3	5.3	2.4	3.0
F35 (His50 Pro)	322	14.1	SYC	SYC	148. 4	148. 4	0.23	0.24	5.2	5.2	2.7	4.2
F36 (His55 Pro)	307	14.6	SYC	SYC	148. 9	147. 1	0.22	0.27	5.5	5.4	3.4	4.7
F37 (FedBa tch)	300	23.3	CC	CC	150. 3	150. 5	0.03	0.03	5.3	5.2	5.3	2.6

SYC: 微黄澄清, 无可见异物

CC: 无色澄清, 无可见异物

(2) SEC

如表格 40 和图 33 所示, 经 40°C 处理 4/6 周后, 所有处方的 SEC HMW% 均有所上升, MP%

下降, F31 (Ace50Suc)和 F32 (His50Suc)主峰下降更多, F33 (His55Suc)和 F36 (His55Pro)下降较少。同样处方的 F31 (Ace50Suc)和 F37 (Fed-Batch)相比, Fed-batch 来源的原液要比 Perfusion 在 40°C 条件下 SEC 主峰下降更少。

表 40 SEC 结果_高温实验

处方	HMW%				MP%				LMW%			
	T0	2W	4W	6W	T0	2W	4W	6W	T0	2W	4W	6W
F31 (Ace50Suc)	2.9	6.9	8.8	10.1	95.1	92.3	90.0	89.3	1.9	0.8	1.2	0.7
F32 (His50Suc)	2.8	6.4	8.5	NT	95.3	93.7	90.2	NT	1.9	ND	1.2	NT
F33 (His55Suc)	3.1	6.6	8.0	NT	95.0	93.5	90.9	NT	1.9	ND	1.1	NT
F34 (Ace50Pro)	2.8	6.4	8.2	NT	95.2	93.3	90.7	NT	2.0	0.2	1.2	NT
F35 (His50Pro)	2.8	6.2	8.3	NT	95.1	92.9	90.4	NT	2.1	0.9	1.3	NT
F36 (His55Pro)	2.9	6.3	7.7	NT	95.4	92.7	91.2	NT	1.6	1.1	1.1	NT
F37 (FedBatch)	0.2	1.2	1.9	2.6	99.7	98.7	98.0	96.9	0.1	0.1	0.2	0.5

(3) NR CE-SDS

如表格 38 和图 34 所示, 经 40°C 处理 4/6 周后所有处方的 NR CE-SDS LMW%均有一定程度增加, MP%下降, 其中 F34 (Ace50Pro)变化最大。同样处方的 F31 (Ace50Suc)和 F37 (Fed-Batch)相比, Fed-batch 来源的 DS 要比 Perfusion 在 40°C 条件下 NR CE-SDS 主峰下降更少。

表 41 NR CE-SDS 结果_高温实验

处方	LMW%				MP%			
	T0	2W	4W	6W	T0	2W	4W	6W
F31 (Ace50Suc)	1.6	2.8	3.3	5.1	97.3	94.1	93.2	90.3
F32 (His50Suc)	1.6	3.2	3.5	NT	97.4	94.2	93.5	NT
F33 (His55Suc)	1.5	3.0	3.5	NT	97.4	94.4	93.3	NT
F34 (Ace50Pro)	1.7	3.9	4.5	NT	97.5	93.5	92.6	NT
F35 (His50Pro)	2.2	3.4	4.6	NT	96.8	94.0	92.7	NT
F36 (His55Pro)	2.3	3.7	4.2	NT	96.8	93.8	93.0	NT
F37 (FedBatch)	1.0	1.8	2.4	3.6	99.0	97.9	97.0	95.4

(4) CEX

如表格 42 和图 35 所示, 经 40°C 处理 4 周后所有处方的酸性峰均增加, MP%下降。相同处方的 F31 (Ace50Suc)比 F37 (Fed-Batch)的 CEX 主峰下降略多。

表 42 CEX 结果_高温实验

处方	酸性峰面积%				MP%				碱性峰面积%			
	T0	2W	4W	6W	T0	2W	4W	6W	T0	2W	4W	6W
F31 (Ace50Suc)	25.5	31.4	38.7	44.7	62.8	54.3	45.9	40.1	11.7	14.3	15.4	15.2
F32 (His50Suc)	25.7	30.7	37.8	NT	62.0	54.8	46.3	NT	12.4	14.4	16.0	NT
F33 (His55Suc)	27.0	32.1	39.4	NT	61.1	54.2	45.6	NT	11.9	13.7	15.0	NT
F34 (Ace50Pro)	27.0	33.2	39.8	NT	61.4	53.0	45.7	NT	11.6	13.8	14.5	NT
F35 (His50Pro)	26.9	31.6	37.8	NT	61.6	54.1	47.0	NT	11.5	14.3	15.2	NT
F36 (His55Pro)	26.7	32.3	39.1	NT	62.1	53.7	46.5	NT	11.2	14.0	14.4	NT
F37 (FedBatch)	12.8	20.2	27.3	35.2	67.5	59.5	53.2	47.2	19.7	20.3	19.5	17.6

(5) 活性

如表格 43 所示, 在 40°C 放置 4 周后, 各处方的活性没有显著差异。

表 43 活性结果_高温实验

处方	细胞活性%	
	T0	40°C4W
F31 (Ace50Suc)	NT	92
F32 (His50Suc)	NT	92
F33 (His55Suc)	NT	104
F34 (Ace50Pro)	NT	96
F35 (His50Pro)	NT	93
F36 (His55Pro)	NT	92
F37 (FedBatch)	103	95

2.2. 25°C 实验

经 25°C 处理 4 周后所有处方外观、Conc.、pH 和 OD405 均无变化。所有样品的纯度 (SEC, NR CE-SDS, CEX) 均发生中等程度的下降, 其中 F31 (Ace50Suc) 的 SEC 变化最多, F34 (Ace50Pro) 的 NR CE-SDS 变化最大。总体而言组氨酸缓冲体系优于醋酸缓冲体系, 具体降解趋势如图 36, 图 37 和图 38 所示。

2.3. 光照

经光照处理 3 天后所有处方外观、DLS, Conc.、pH 和 OD405 均无变化。各组处方的纯度均发生下降, 具体趋势如图 39, 图 40 和图 41 所示。F35 (His50Pro)的 SEC HMW%和 NR CE-SDS LMW%增加最少。F33 (His55Suc)和 F36 (His55Pro)的 CEX 变化最小。

2.4. 振摇

经 200 rpm 振摇处理 10 天后所有处方外观、DLS, Conc.、pH 和 OD405 均无变化。纯度方面 CEX 无明显变化, 经 200 rpm 振摇 10 天后, 所有处方的 SEC 和 NR CE-SDS 均发生变化, 其中 F32 (His50Suc)的 LMW%增加最少, 其余处方无明显差异, 具体趋势如图 42、图 43 和图 44 所示。经过 200 rpm 振摇 10 天后, 各处方的不溶性微粒数量无明显差异。

3. 总结

25°C 4 周条件下, 各个处方的外观、DLS、OD405 等结果均无明显变化, 但 F31(Ace50Suc)的 SEC 较其他处方变化更多, F34 (Ace50Pro)的 NR CE-SDS 较其他处方变化更多。

40°C 4 周条件下, 外观、Conc.、pH、DLS 均无变化, 但 F31 (Ace50Suc), F32 (His50Suc), F33 (His55Suc), F34 (Ace50Pro)和 F36 (His55Pro)的 OD405 略有上升, 所有处方的 SEC、CEX 和 NR CE-SDS 的主峰有一定程度下降。F31 (Ace50Suc)和 F32 (His50Suc)SEC 变化程度大于其余处方, 而 F34 (Ace50Pro)的 NR CE-SDS 变化略微大于其余处方。相同处方的不同工艺的灌流工艺 F31 (Ace50Suc)与批次补料的 F37 (Fed-Batch)相比, 批次补料工艺的 F37 (Fed-Batch)在 40°C 条件下, 所有纯度变化均小于灌流工艺的 F31 (Ace50Suc)。

光照 3 天的条件下, 各个处方的浓度, 外观, pH 和 DLS 等结果均无明显变化。SEC, NR CE-SDS 和 CEX 主峰均有下降, 其中 F35 (His50Pro)的 SEC 和 NR CE-SDS 主峰下降程度小于其余处方, F33 (His55Suc)和 F36 (His55Pro)CEX 主峰下降程度小于其余处方。

振摇条件下, 各个处方的浓度, 外观, pH, DLS、OD405、CEX 主峰等结果均无明显变化。SEC 和 NR CE-SDS 主峰略有下降, 可能是由于振摇实验是在 25°C 条件下进行所导致的。其中 F35 (His50Pro)的 SEC 变化最小, F32 (His50Suc)的 NR CE-SDS 变化最小。

本研究中选用了 pH 5.0 的醋酸缓冲液以及 pH 5.0 和 pH 5.5 组氨酸缓冲液, 搭配蔗糖和脯氨酸, 0.05%的聚山梨酯 80 进行试验, 考察了光照, 振摇, 25°C, 40°C 的压力条件。此外, 还比较了灌流和批次补料培养工艺生产的原液稳定性的差异。结果显示, 在 40°C, 25°C 和光照下, 组氨酸缓冲液纯度变化小于醋酸缓冲液, 且批次补料的工艺较灌流工艺生产的原液在 40°C 下更稳定, 考虑到组氨酸对皮下注射更友好, 蔗糖在生物制剂中使用得更为广泛, 因此选择 10 mM Histidine, pH 选择 5.0 和 5.5 中间值 5.3 搭配蔗糖进行最终处方确认实验。

实施例 22: 高浓度蛋白中表面活性剂浓度筛选实验

1. 实验设计

样品处方信息, 稳定性实验放置条件和检测方法如表格 44 所示。UFD 样品用相应的辅料储备液稀释至 100 mg/mL, 最后用 0.22 μ m PVDF 膜过滤制备得到。分别取 2 mL 样品至 6R 西

林瓶中以进行搅拌试验，2 mL 样品至 2R 西林瓶中进行振摇试验。

表 44 第二次表面活性剂浓度筛选实验设计方案

处方	浓度	原液工艺	处方信息	稳定性条件
F38 (0.025%)	100 mg/mL	Fed-batch	10 mM Histidine pH5.3, 6.0% sucrose, 0.025% 聚山梨酯 80	T0 振摇(200 rpm, 5D) 搅拌 (200 rpm, 2H)
F39 (0.05%)			10 mM Histidine pH5.3, 6.0% sucrose, 0.05% 聚山梨酯 80	
F40 (0.1%)			10 mM Histidine pH5.3, 6.0% sucrose, 0.1% 聚山梨酯 80	
检测项	T0: 外观, OD405, pH, 浓度, 渗透压, SEC, MFI 搅拌/振摇:外观, OD405, SEC, MFI			

2. 结果

在本试验中，考察了 0.025%，0.05%和 0.1%等 3 个浓度的聚山梨酯 80，并对样品进行了振摇和搅拌等压力测试，结果显示各聚山梨酯 80 浓度下，样品的外观、不溶性微粒，粒径、纯度 (SEC) 等结果无明显区别，均满足试验要求，选择 0.05%的中间浓度进入最终处方确认试验。

表 45 第二次表面活性剂浓度筛选实验结果

检测项目 Test Items	F38 (0.025%)			F39 (0.05%)			F40 (0.1%)			
	T0	M2H	A5D	T0	M2H	A5D	T0	M2H	A5D	
渗透压 (mOsm/kg H ₂ O)	278	NT								
pH	5.2	NT		5.2	NT		5.2	NT		
外观	SOC	HOC	SOC	SOC	HOC	SOC	SOC	HOC	SOC	
浓度	91.1	NT	NT	91.1	NT	NT	92.8	NT	NT	
OD405	0.03	0.06	0.04	0.03	0.05	0.04	0.04	0.06	0.04	
MFI	≥ 2 μm	3202	8155	99	61	28963	42	61	9428	134
	≥ 10 μm	15	0	0	0	214	0	0	61	0
	≥ 25 μm	0	0	0	0	23	0	0	11	0
DLS	单峰 粒径 (nm)	4.0	4.1	4.4	4.0	4.4	4.2	4.1	4.3	4.1
SEC	高分子 量	1.0	1.0	1.2	1.0	1.1	1.3	1.1	1.1	1.3
	主 峰%	92.5	92.5	92.2	92.4	92.6	92.2	92.4	92.5	92.0

检测项目 Test Items	F38 (0.025%)			F39 (0.05%)			F40 (0.1%)		
	T0	M2H	A5D	T0	M2H	A5D	T0	M2H	A5D
低分子 量%	6.5	6.4	6.6	6.6	6.4	6.6	6.5	6.4	6.7

NT=未检测

实施例 23: 处方确认实验

1. 实验设计

样品处方信息, 稳定性实验放置条件和检测方法如表格 46 所示。将 UDFD 样品用母液稀释至目标浓度的蛋白、蔗糖和聚山梨酯 80, 然后用 0.22 μm PVDF 膜过滤, 分别取 2 mL 样品至 2R 西林瓶以进行 -40°C 、 -20°C 、 5°C 、 25°C 、 40°C 稳定性、 $-20^{\circ}\text{C}/-40^{\circ}\text{C}$ 冻融、振摇和光照试验, 取 2 mL 样品至 6R 西林瓶中以进行搅拌试验, 2 mL 样品至 5 mL PC 瓶中进行 -80°C 冻融试验。

表 46 制剂处方确认研究方案

制剂处方	浓度	处方信息	稳定性条件	检测项
F41	100 mg/mL	10 mM Histidine, 7.0% 蔗糖, 0.05%, 聚山梨酯 80, pH 5.3	T0	X, Z, U
			冻融 ($-80/-40/-20^{\circ}\text{C}$, 5 cycles)	X, Z
			搅拌(200 rpm, 2 H)	X
			振摇 (10D)	X, Z
			光照 (7 D, 78.5% ICH intensity)	X, Y
			Stressed (40°C , 2, 4, 6 W, 4 W Invert)	X, Y (4W), T
			加速 (25°C , 2, 4, 6 W)	X, T
			长期 ($5/-20/-40^{\circ}\text{C}$, 1, 3, 6 M)	X
X: 外观, 蛋白含量, pH, DLS, OD405, SEC, NR-CE-SDS, CEX; Y: 活性; Z: MFI; U: 渗透压摩尔浓度, 黏度 T: PS80.				

2. 结果

在处方确认实验中, 对选定的处方进行了不同温度下的冻融、搅拌、振摇、光照、强制降解 (40°C), 加速 (25°C), 长期 ($5/-20/-40^{\circ}\text{C}$) 等条件的考察, 结果显示冻融、搅拌、振摇、长期条件下, 样品的纯度均无明显变化, 25°C 和光照条件下, 纯度有所下降, 40°C 条件下 6 周后, 样品的纯度发生显著下降, 但不影响结合活性, 且处方中的 PS80 浓度没有发生下降。

最终处方确认实验的结果如表格 47、48、49 和表格 50 所示。

在 5°C, -20°C 和 -40°C 长期稳定性考察实验中, 样品外观、DLS、SEC、CEX 和 NR-CE-SDS 等结果均无明显变化。

25°C 条件下, 6 周时各个处方无明显变化, 3 个月和 6 个月后 CEX 主峰略有下降。聚山梨酯 80 的含量无明显下降。

40°C 条件下放置 6 周, 样品 SEC、CEX 和 NR-CE-SDS 主峰均发生显著下降, 但聚山梨酯 80 的含量并无明显下降。

光照 7 天的条件下, 样品的外观和 DLS 等结果均无明显变化。纯度有轻微下降, 但不影响结合活性。

冻融条件下, 样品的外观、DLS、SEC、CEX、NR-CE-SDS 等结果均无明显变化。且不溶性微粒的浓度没有明显增加。不同温度的冷冻条件对样品的冻融稳定性无明显影响。

在 200 rpm 搅拌 2 小时后, 样品的外观由轻微乳光变为浑浊, 因此未对不溶性微粒进行检测, 其余结果无明显变化。

在 25°C 下以 200 rpm 转速振摇两周后, 样品的外观、DLS、OD405、MFI, SEC, NR-CE-SDS 和 CEX 主峰等结果均无明显变化。

在 40°C 下倒置 4 周的样品和正置相比, 各检测项无明显差异, 说明包材与蛋白制剂相容

表 47 最终处方确认高温 40°C 实验结果

取样点	SEC			NR CE-SDS		icIEF			
	HMW %	MP %	LMW %	MP %	LMW %	酸性峰%	主峰%	碱性峰%	
T0	1	99	ND	98.2	1.5	24.9	68.1	7	
40 °C	2W	1.5	98.2	0.2	97.4	2.3	31	61.6	7.5
	4W	2.5	97	0.4	94	4.8	43	49.4	7.5
	4WI	2.6	96.9	0.5	94.1	4.7	42.8	49.7	7.5
	6W	3	96.3	0.7	90.5	7.6	52.4	40.9	6.7
取样点	外观	粒径(nm)	OD405	蛋白质含量 (mg/mL)	PH 值	渗透压 (mOsmol/kg)	黏度 cP	活性 %	PS80 %
T0	SOC	4.5	0.05	104.3	5.4	293	6.8	90	NT
40 °C	2W	SOC	4.4	0.05	105.2	NT	NT	NT	0.044
	4W	SOC	4.6	0.06	105.6	5.3	NT	NT	0.043
	4WI	SOC	4.4	0.07	105.7	5.3	NT	NT	NT
	6W	SOC	3.9	0.06	103.3	5.5	NT	NT	0.040

表 48 最终处方确认加速(25°C)稳定性实验结果

取样点	SEC			NR CE-SDS		icIEF			
	HMW %	MP %	LMW %	MP %	LMW %	酸性峰%	主峰%	碱性峰%	
T0	1	99	ND	98.2	1.5	24.9	68.1	7	
25 °C	2W	1	99	ND	98.6	1.3	23.1	70	6.9
	4W	1.2	98.7	0.1	98.1	1.5	23.8	69.7	6.5
	6W	1.3	98.6	0.1	98	1.6	25.2	68.3	6.5

	3M	1.2	98.7	0.1	98.7	1.2	29	65	6
	6M	1.4	98.4	0.2	98.7	1.3	32.2	61.3	6.5
取样点	外观	粒径(nm)	OD405	蛋白质含量(mg/mL)	PH值	渗透压(mOsmol/kg)	黏度(cP)	活性%	PS80%
T0	SOC	4.5	0.05	104.3	5.4	293	6.8	90	NT
25℃	2W	SOC	3.8	0.04	106.1	NT	NT	NT	NT
	4W	SOC	4	0.04	106.6	5.4	NT	NT	0.044
	6W	SOC	4.1	0.04	103	5.3	NT	NT	0.044
	3M	SOC	4.7	0.04	104.6	5.3	NT	NT	0.046
	6M	SOC	4.2	0.04	106.8	5.4	NT	NT	0.04

表 49 最终处方确认长期(5℃/-20℃/-40℃)稳定性实验结果

取样点	SEC			NR CE-SDS		icIEF				
	HMW %	MP %	LMW %	MP %	LMW %	酸性峰%	主峰%	碱性峰%		
T0	1	99	ND	98.2	1.5	24.9	68.1	7		
5℃	1M	1	99	ND	98.3	1.2	22.5	70.9	6.6	
	3M	1	99	0	98.8	1.1	25.8	68.1	6.1	
	6M	1.1	98.9	ND	98.8	1.2	25	68.2	6.8	
-20℃	1M	1	99.1	ND	98.5	1.3	22.7	70.3	7	
	3M	0.9	99.1	ND	98.7	1.2	25.6	68.1	6.3	
	6M	1	99	ND	98.6	1.4	24.7	68.4	6.9	
-40℃	1M	1	99	ND	98.4	1.3	22.8	70.3	7	
	3M	0.9	99.1	ND	98.4	1.4	25	68.5	6.5	
	6M	1	99	ND	98.6	1.4	24.1	69.2	6.7	
取样点	外观	粒径(nm)	OD405	蛋白质含量(mg/mL)	PH值	渗透压(mOsmol/kg)	黏度(cP)	活性%	PS80%	
T0	SOC	4.5	0.05	104.3	5.4	293	6.8	90	NT	
5℃	1M	SOC	4	0.05	105.9	5.3	NT	NT	NT	NT
	3M	SOC	4.4	0.04	104.4	5.3	NT	NT	NT	NT
	6M	SOC	4.2	0.04	106.6	5.4	NT	NT	NT	NT
-20℃	1M	SOC	4.5	0.05	106.2	5.3	NT	NT	NT	0.043
	3M	SOC	4.5	0.04	104.8	5.3	NT	NT	NT	NT
	6M	SOC	4.1	0.04	105.1	5.4	NT	NT	NT	NT
-40℃	1M	SOC	4	0.04	105.8	5.3	NT	NT	NT	0.043
	3M	SOC	4.4	0.04	104.3	5.3	NT	NT	NT	NT
	6M	SOC	3.9	0.04	105.2	5.4	NT	NT	NT	NT

表 50 最终处方确认搅拌、冻融、光照、振摇实验结果

取样点	SEC			NR CE-SDS		icIEF			MFI		
	HMW %	MP %	LMW %	MP %	LMW %	酸性峰%	主峰%	碱性峰%	≥ 2μm	≥ 10μm	≥ 25μm

	T0	1	99	ND	98.2	1.5	24.9	68.1	7.0	61	0	0
搅拌	2H	1	99	ND	98.3	1.3	22.9	70.2	6.9	NT	NT	NT
冻融	-80°C	1	98.9	0.1	98.4	1.3	23.4	70.3	6.3	31	42	23
	-40°C	1.1	98.8	0.1	98.3	1.4	22.5	70.8	6.7	260	4	0
	-20°C	1	98.8	0.1	98.4	1.3	22.7	70.4	6.9	92	0	0
光照	7D	2.8	97.1	0.1	96.7	2	28	65.3	6.7	NT	NT	NT
振摇	10D	1	99	ND	98.1	1.6	22.7	70.6	6.8	149	0	0
取样点		外观	粒径 (nm)	OD405	蛋白质含量 (mg/mL)	PH 值	渗透压 (mOsmol/kg)		黏度 cP	活性 %	PS80 %	
T0		SOC	4.5	0.05	104.3	5.4	293		6.8	90	NT	
搅拌	2H	Turbid	4.4	0.06	103.7	5.4	NT		NT	NT	NT	
冻融	-80°C	SOC	4.0	0.04	103.5	5.4	NT		NT	NT	NT	
	-40°C	SOC	4.2	0.04	104	5.4	NT		NT	NT	NT	
	-20°C	SOC	4.1	0.04	103.9	5.4	NT		NT	NT	NT	
光照	7D	SOC	4.5	0.04	102.7	5.3	NT		NT	96	NT	
振摇	10D	SOC	4	0.04	103.2	5.3	NT		NT	NT	NT	

SOC=轻微乳光、Turbid=浑浊、NT=未检测

3. 总结

高浓度最终处方在-40°C, -20°C, 5°C 和 25°C 条件下均能保持长时间的稳定, 对冻融和振摇的耐受性较好。在光照和搅拌条件下会发生变化, 在 40°C 条件下变化较大, 因此该样品应该注意防止长时间光照, 高温和剧烈搅拌。

本发明的范围不受本文所述的具体实施方案限制。实际上, 除所描述的那些以外, 根据前述描述和附图, 本文提供的多种修改对于本领域技术人员来说将变得显而易见。此类修改意图属于所附权利要求的范围之内。

权利要求

1. 一种稳定液体药物制剂，其包含：

- (a) 特异性结合至人 MASP-2 的单克隆抗体或其抗原结合片段；
- (b) 包含组氨酸和/或醋酸缓冲体系的缓冲液；
- (c) 包含聚山梨酯的表面活性剂；和
- (d) 包含蔗糖、海藻糖和/或脯氨酸的辅料；

其中所述制剂的 pH 为 4.7-6.1，优选 5.0-6.0，更优选 5.0-5.5，最优选 5.3。

2. 根据权利要求 1 所述的药物制剂，其中所述制剂具有以下特性中的一项或多项：

- (i) 平均粒径为 2-10 μm ；
- (ii) 质量渗透压摩尔浓度为 250~350 mOsm/kg H₂O 之间；
- (iii) 粘度为约 1.0 厘泊- 30 厘泊，例如约 1.0 厘泊- 10 厘泊；
- (iv) 在 40°C 或 25°C 下放置 6 周或振摇 14 天后，外观保持或基本保持轻微乳光或澄清状态，平均粒径不变或基本不变，且溶解状态下的抗体单体纯度超过 95%，优选 98%，更优选 99%；
- (v) 在 4°C 下放置 1 年-3 年后，外观保持或基本保持轻微乳光或澄清状态，平均粒径不变或基本不变，且溶解状态下的抗体单体纯度超过 95%，优选 98%，更优选 99%；
- (vi) 光照 3 天后，外观保持或基本保持轻微乳光或澄清状态，平均粒径不变或基本不变，且溶解状态下的抗体单体纯度超过 95%，优选 98%，更优选 99%；
- (vii) 搅拌 6 小时后，外观保持或基本保持轻微乳光或澄清状态，平均粒径不变或基本不变，且溶解状态下的抗体单体纯度超过 95%，优选 98%，更优选 99%；和
- (viii) 经 5 轮冻融后，外观保持或基本保持轻微乳光或澄清状态，平均粒径不变或基本不变，且溶解状态下的抗体单体纯度超过 95%，优选 98%，更优选 99%。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物制剂，其中所述抗体浓度为 10 mg/ml \pm 1 mg/ml 至 200 mg/ml \pm 20 mg/mL。

4. 根据权利要求 3 所述的药物制剂，其中所述抗体浓度为 20 mg/ml \pm 2 mg/mL。

5. 根据权利要求 3 所述的药物制剂，其中所述抗体浓度为 60 mg/ml \pm 6 mg/ml。

6. 根据权利要求 3 所述的药物制剂，其中所述抗体浓度为 100 mg/ml \pm 10 mg/ml。

7. 根据权利要求 3 所述的药物制剂，其中所述抗体浓度为 150 mg/ml \pm 15 mg/ml。

8. 根据权利要求 3 所述的药物制剂，其中所述抗体浓度为约 20 mg/ml 至约 100 mg/ml。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的药物制剂，其中所述缓冲液包含组氨酸，并且组氨酸浓度为 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM。

10. 根据权利要求 9 所述的药物制剂，其中所述缓冲液浓度为 $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ 。
11. 根据权利要求 10 所述的药物制剂，其中所述缓冲液包含 L-组氨酸和一水合 L-组氨酸盐酸盐。
12. 根据权利要求 11 所述的药物制剂，其中所述缓冲液包含约 0.175 mg/ml 的 L-组氨酸和约 1.86 mg/ml 的一水合 L-组氨酸盐酸盐。
13. 根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的药物制剂，其中所述聚山梨醇酯浓度为 $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ (w/v)。
14. 根据权利要求 13 所述的药物制剂，其中所述聚山梨醇酯浓度为 $0.05\% \pm 0.01\%$ (w/v)。
15. 根据权利要求 1 至 14 中任一项所述的药物制剂，其中所述聚山梨醇酯为聚山梨醇酯 80 或聚山梨醇酯 20，优选为聚山梨醇酯 80。
16. 根据权利要求 1 至 15 中任一项所述的药物制剂，其中所述辅料包含蔗糖。
17. 根据权利要求 16 所述的药物制剂，其中所述蔗糖浓度为 $5.5\% \pm 0.5\%$ 至 $9\% \pm 0.5\%$ (w/v)。
18. 根据权利要求 17 所述的药物制剂，其中所述蔗糖浓度为 $5.8\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v)。
19. 根据权利要求 18 所述的药物制剂，其中所述蔗糖浓度为 $5.8\% \pm 0.5\%$ (w/v)。
20. 根据权利要求 18 所述的药物制剂，其中所述蔗糖浓度为 $6.0\% \pm 0.5\%$ (w/v)。
21. 根据权利要求 18 所述的药物制剂，其中所述蔗糖浓度为 $6.5\% \pm 0.5\%$ (w/v)。
22. 根据权利要求 18 所述的药物制剂，其中所述蔗糖浓度为 $7.0\% \pm 0.5\%$ (w/v)。
23. 根据权利要求 18 所述的药物制剂，其中所述蔗糖浓度为 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v)。
24. 根据权利要求 1 所述的药物制剂，其包含：
 - (a) $20 \text{ mg/ml} \pm 2 \text{ mg/ml}$ 抗体，
 - (b) 包含 $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 至 $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ 组氨酸或醋酸的缓冲液，
 - (c) $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨醇酯 80，和
 - (d) $6.5\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖或海藻糖，pH 为 5.3 ± 0.5 。
25. 根据权利要求 24 所述的药物制剂，其包含：
 - (a) $20 \text{ mg/ml} \pm 2 \text{ mg/ml}$ 抗体，
 - (b) 包含 $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ 组氨酸的缓冲液，
 - (c) $0.05\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨醇酯，和
 - (d) $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖，

pH 为 5.3 ± 0.1 。

26. 根据权利要求 25 所述的药物制剂，其包含：

- (a) 20 mg/ml \pm 2 mg/ml 抗体，
- (b) 约 0.175 mg/ml L-组氨酸，
- (c) 约 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物，
- (d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨醇酯，和
- (e) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖，

pH 为 5.3 ± 0.1 。

27. 根据权利要求 1 所述的药物制剂，其包含：

- (a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体，
- (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液，
- (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨醇酯，和
- (d) 6.5% \pm 0.5% 至 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖或海藻糖，

pH 为 5.3 ± 0.5 。

28. 根据权利要求 27 所述的药物制剂，其包含：

- (a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体，
- (b) 包含 10 mM \pm 2 mM 组氨酸缓冲体系的缓冲液，
- (c) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨醇酯，和
- (d) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖，

pH 为 5.3 ± 0.1 。

29. 根据权利要求 28 所述的药物制剂，其包含：

- (a) 60 mg/ml \pm 6 mg/ml 抗体，
- (b) 约 0.175 mg/ml L-组氨酸，
- (c) 约 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物，
- (d) 0.05% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨醇酯，和
- (e) 8.6% \pm 0.5% (w/v) 蔗糖，

pH 为 5.3 ± 0.1 。

30. 根据权利要求 1 所述的药物制剂，其包含：

- (a) 100 mg/ml \pm 10 mg/ml 抗体，
- (b) 包含 5 mM \pm 1 mM 至 20 mM \pm 4 mM 组氨酸或醋酸的缓冲液，
- (c) 0.025% \pm 0.01% 至 0.1% \pm 0.01% (w/v) 聚山梨醇酯，和

(d) $6.5\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖或海藻糖，
pH 为 5.3 ± 0.5 。

31. 根据权利要求 30 所述的药物制剂，其包含：

- (a) $100 \text{ mg/ml} \pm 10 \text{ mg/ml}$ 抗体，
- (b) 包含 $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 组氨酸缓冲体系的缓冲液，
- (c) $0.05\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨醇酯，和
- (d) $7.0\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖，
pH 为 5.3 ± 0.1 。

32. 根据权利要求 31 所述的药物制剂，其包含：

- (a) $100 \text{ mg/ml} \pm 10 \text{ mg/ml}$ 抗体，
- (b) 约 0.175 mg/ml L-组氨酸，
- (c) 约 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物，
- (d) $0.05\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨醇酯，和
- (e) $7.0\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖，
pH 为 5.3 ± 0.1 。

33. 根据权利要求 1 所述的药物制剂，其包含：

- (a) $150 \text{ mg/ml} \pm 15 \text{ mg/ml}$ 抗体，
- (b) 包含 $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 至 $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ 组氨酸或醋酸的缓冲液，
- (c) $0.025\% \pm 0.01\%$ 至 $0.1\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨醇酯，和
- (d) $6.5\% \pm 0.5\%$ 至 $8.6\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖或海藻糖，
pH 为 5.3 ± 0.5 。

34. 根据权利要求 33 所述的药物制剂，其包含：

- (a) $150 \text{ mg/ml} \pm 15 \text{ mg/ml}$ 抗体，
- (b) 包含 $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ 组氨酸缓冲体系的缓冲液，
- (c) $0.05\% \pm 0.01\%$ (w/v) 聚山梨醇酯，和
- (d) $7.0\% \pm 0.5\%$ (w/v) 蔗糖，
pH 为 5.3 ± 0.1 。

35. 根据权利要求 34 所述的药物制剂，其包含：

- (a) $150 \text{ mg/ml} \pm 15 \text{ mg/ml}$ 抗体，
- (b) 约 0.175 mg/ml L-组氨酸，
- (c) 约 1.86 mg/ml L-组氨酸一盐酸盐一水合物，

(d) 0.05% ± 0.01% (w/v) 聚山梨醇酯, 和

(e) 7.0% ± 0.5% (w/v) 蔗糖,

pH 为 5.3 ± 0.1。

36. 根据权利要求 21 至 35 中任一项所述的药物制剂, 其中所述聚山梨醇酯为聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80, 优选聚山梨醇酯 80。

37. 根据权利要求 1 至 36 中任一项所述的药物制剂, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区, 其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中: HCDR1 的氨基酸序列如 **DYYIN** (SEQ ID NO: 1) 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **WIFPGSX₁ SX₂ YX₃ X₄ X₅ X₆ FX₇ X₈** (SEQ ID NO: 2) 所示, 并且 HCDR3 的氨基酸序列如 **GDRSGPFX₉ Y** (SEQ ID NO: 3) 所示;

和/或

所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中: LCDR1 的氨基酸序列如 **KSSQSLLYSNGKTYLN** (SEQ ID NO: 4) 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 **LVSKLDS** (SEQ ID NO: 5) 所示, 并且 LCDR3 的氨基酸序列如 **VQX₁₀ THFPFT** (SEQ ID NO: 6) 所示,

其中 X₁ 是 E、D 或 G, X₂ 是 A 或 P, X₃ 是 H 或 Y, X₄ 是 S 或 N, X₅ 是 E 或 Q, X₆ 是 K 或 N, X₇ 是 K 或 Q, X₈ 是 A 或 G, X₉ 是 A 或 P, 并且 X₁₀ 是 V 或 G。

38. 根据权利要求 37 所述的药物制剂, 其中 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 7**、**SEQ ID NO: 8**、**SEQ ID NO: 9** 或 **SEQ ID NO: 10** 所示, 并且 HCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 11** 或 **SEQ ID NO: 12** 所示; 和/或 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且 LCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 13** 或 **SEQ ID NO: 14** 所示。

39. 根据权利要求 1 至 36 中任一项所述的药物制剂, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区, 其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中:

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 7** 所示, 并且 HCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 11** 所示; 或

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 9** 所示, 并且 HCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 12** 所示; 或

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 10** 所示, 并且 HCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 11** 所示; 或

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 8** 所示, 并且 HCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 11** 所示。

40. 根据权利要求 39 所述的药物制剂,其中所述抗体或其抗原结合片段进一步包含轻链可变区,其中轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,其中:

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示,并且 LCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 13** 所示;或

LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示,并且 LCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 14** 所示。

41. 根据权利要求 37-40 任一项所述的药物制剂,其中:

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 7** 所示, HCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 11** 所示, LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示,并且 LCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 13** 所示;或

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 9** 所示, HCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 12** 所示, LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示,并且 LCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 13** 所示;或

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 10** 所示, HCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 11** 所示, LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示,并且 LCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 14** 所示;或

HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, HCDR2 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 8** 所示, HCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 11** 所示, LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示,并且 LCDR3 的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 13** 所示。

42. 根据权利要求 37-41 任一项所述的药物制剂,其中所述重链可变区包含选自 SEQ ID NO: 15、17、18、20、22、24 和 26 中任一者的序列或与其具有至少 80%序列同一性的序列。

43. 根据权利要求 42 所述的药物制剂,其中所述轻链可变区包含选自 SEQ ID NO: 16、19、28 和 30 中任一者的序列或与其具有至少 80%序列同一性的序列。

44. 根据权利要求 37-41 任一项所述的药物制剂,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

包含如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列的重链可变区,和包含如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列的轻链可变区;或

包含如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列的重链可变区,和包含如 SEQ ID NO: 16 所示

的氨基酸序列的轻链可变区；或

包含如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列的轻链可变区；或

包含如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列的轻链可变区；或

包含如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列的轻链可变区；或

包含如 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列的轻链可变区；或

包含如 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列的轻链可变区；或

包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列的轻链可变区；或

包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列的轻链可变区；或

包含如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列的轻链可变区；或

包含如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

45. 根据权利要求 37-44 任一项所述的药物制剂，其中所述抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白恒定区，任选地包含 IgG 的重链恒定区，和/或轻链恒定区。

46. 根据权利要求 45 所述的药物制剂，其中所述恒定区包含小鼠恒定区、兔恒定区或人恒定区，任选地，所述恒定区包含人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区。

47. 根据权利要求 45 所述的药物制剂，其中所述重链恒定区包含相对于野生型人 IgG 恒定区在氨基酸残基 252、254 或 256 处的一个或多个氨基酸取代，任选地，氨基酸残基 252 处的氨基酸取代是被酪氨酸取代，氨基酸残基 254 处的氨基酸取代是被苏氨酸取代，氨基酸残基 256 处的氨基酸取代是被谷氨酸取代。

48. 根据权利要求 47 所述的药物制剂，其中所述重链恒定区包含与野生型人 IgG 恒定区氨基酸序列具有至少 80% 同一性的序列，并且相对于野生型人 IgG 恒定区具有氨基酸残基 252 处被酪氨酸取代，氨基酸残基 254 处被苏氨酸取代，和氨基酸残基 256 处被谷氨酸取代。

49. 一种药物组合物，其中所述组合物包含根据权利要求 1 至 48 中任一项的药物制剂，且

所述组合物容纳于容器中。

50. 根据权利要求 49 所述的药物组合物，其中所述容器为小瓶，例如西林瓶。

51. 根据权利要求 49 所述的药物组合物，其中所述容器为注射器。

52. 根据权利要求 49 所述的药物组合物，其中所述容器为预填充注射器。

53. 根据权利要求 49 所述的药物组合物，其容纳于自动注射器中。

54. 根据权利要求 49 至 53 中任一项所述的药物组合物，其中所述容器包含包括气体的顶隙，其中所述气体包含小于 5 体积%的氧气，优选包含小于 1 体积%的氧气，更优选包含不超过 0.1 体积%的氧气。

55. 一种试剂盒，其包含：

(i) 含有包含根据权利要求 1 至 48 中任一项所述的药物制剂的组合物的容器，和使用所述组合物的说明书；或

(ii) 含有包含根据权利要求 49 至 54 中任一项所述的药物组合物的容器，和使用所述组合物的说明书。

56. 一种包含根据权利要求 1 至 48 中任一项所述的药物制剂的单位剂型，其中所述抗体以 0.1 mg 至 500 mg 的量存在。

57. 根据权利要求 56 所述的单位剂型，其中所述抗体以 200mg 的量存在或所述抗体以 400mg 的量存在。

58. 根据权利要求 56 或 57 所述的单位剂型，其为玻璃小瓶，例如西林瓶。

59. 根据权利要求 56 或 57 所述的单位剂型，其为预填充注射器。

60. 根据权利要求 56 或 57 所述的单位剂型，其为自动注射器。

61. 根据权利要求 56 或 57 所述的单位剂型，其中所述玻璃小瓶包含包括气体的顶隙，其中所述气体包含小于 5 体积%的氧气，优选包含小于 1 体积%的氧气，更优选包含不超过 0.1 体积%的氧气。

62. 一种抑制 MASP-2 依赖性补体激活的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 48 中任一项所述的药物制剂，或权利要求 59-54 中任一项所述的药物组合物，或权利要求 55 所述的试剂盒，或权利要求 56-61 所述的单位剂型。

63. 一种降低受试者血清 C4 水平的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 48 中任一项所述的药物制剂，或权利要求 59-54 中任一项所述的药物组合物，或权利要求 55 所述的试剂盒，或权利要求 56-61 所述的单位剂型。

64. 一种治疗受试者中疾病或病症的方法，所述疾病或病症(1) 将受益于受试者血清 C4 水平的降低；(2) 与血清 C4 水平异常（例如升高）相关；(3) 将受益于抑制 MASP-2 依赖性补体

激活；和/或(4) 与 MASP-2 依赖性补体激活相关，

所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 48 中任一项所述的药物制剂，或权利要求 59-54 中任一项所述的药物组合物，或权利要求 55 所述的试剂盒，或权利要求 56-61 所述的单位剂型。

65. 权利要求 1 至 48 中任一项所述的药物制剂，或权利要求 59-54 中任一项所述的药物组合物，或权利要求 55 所述的试剂盒，或权利要求 56-61 所述的单位剂型在制备药剂中的用途，所述药剂用于用于以下中的一者或多者：

- (1) 用于抑制 MASP-2 依赖性补体激活；
- (2) 用于治疗或预防 MASP-2 依赖性补体激活相关疾病或病症；
- (3) 用于治疗受试者中受益于抑制 MASP-2 依赖性补体激活的病症；
- (4) 用于降低受试者血清 C4 水平；
- (5) 用于治疗受试者中受益于受试者血清 C4 水平的降低的病症；
- (6) 用于治疗或预防与血清 C4 水平异常（例如升高）相关的病症或疾病。

66. 权利要求 65 的用途，其中所述疾病或病症为自身免疫性疾病、血管病症、缺血再灌注损伤、动脉硬化、炎症、肺部病症、体外再灌注过程、肌肉骨骼病症、肾脏病症、皮肤病症、器官或组织移植过程、神经系统疾病或损伤、血液疾病、泌尿生殖系统疾病、非肥胖型糖尿病或与 1 型或 2 型糖尿病相关并发症、癌症、内分泌疾病、眼科疾病或 COVID-19。

67. 权利要求 66 的用途，其中：

所述自身免疫性疾病包括血栓性微血管病（TMA）、非典型溶血性尿毒症综合征（aHUS）、造血移植相关的血栓性微血管病（TA-TMA）、狼疮肾炎、系统性红斑狼疮（SLE）和 IgA 肾病；

所述血管病症包括心血管病症、脑血管病症、外周（如肌肉骨骼）血管病症、肾血管病症、肠系膜/肠道血管病症、移植物和/或再移植物的血管再生、血管炎、亨-舍二氏紫癜性肾炎、系统性红斑狼疮相关的血管炎、与类风湿性关节炎相关的血管炎、免疫复合物血管炎、大动脉炎、扩张型心肌病、糖尿病血管病、川崎病（动脉炎）、静脉气体栓塞（VGE），以及支架置入术、旋转动脉瘤切除术和经皮腔内冠状动脉成形术（PTCA）后的再狭窄，

所述缺血再灌注损伤包括与主动脉瘤修复、心肺转流、与器官移植和/或肢体/手指再植有关的血管再吻合、卒中、心肌梗死和休克和/或外科手术后的血液动力学复苏有关的缺血再灌注损伤；

所述炎症包括炎症性胃肠道疾病，其包括胰腺炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征和憩室炎；

所述肺部病症包括急性呼吸窘迫综合征、输血相关性急性肺损伤、缺血/再灌注急性肺损伤、

慢性阻塞性肺病、哮喘、韦格纳肉芽肿病、抗肾小球基底膜病 (Goodpasture 病); 胎粪吸入综合征、闭塞性细支气管炎综合征、特发性肺纤维化、继发于烧伤的急性肺损伤、非心源性肺水肿、输血相关呼吸困难、肺气肿、囊性纤维化、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 (Covid-19) 相关疾病;

所述体外循环再灌注过程包括血液透析、血浆去除术、白细胞去除术、体外膜氧合 (ECMO)、肝素诱导体外膜氧合低密度脂蛋白沉淀 (heparin-induced extracorporeal membrane oxygenation LDL precipitation, HELP) 和心肺转流术 (CPB);

所述肌肉骨骼病症包括骨关节炎、类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、痛风、神经性关节病、银屑病性关节炎、脊椎关节病、结晶性关节病和系统性红斑狼疮 (SLE);

所述肾脏病症包括系膜增生型肾小球肾炎、膜性肾小球肾炎、膜性增生性肾小球肾炎 (系膜毛细血管性肾小球肾炎)、急性感染后肾小球肾炎 (链球菌感染后肾小球肾炎)、冷球蛋白血症性肾小球肾炎、狼疮性肾炎、亨-舍二氏紫癜性肾炎和 IgA 肾病;

所述皮肤病症包括银屑病、自身免疫性大疱性皮肤病、嗜酸性海绵形成、大疱性类天疱疮、获得性大疱性表皮松解、妊娠疱疹、热烧伤和化学烧伤;

所述器官或组织移植过程包括器官异体移植、器官异种移植器官和组织移植;

所述神经系统疾病或损伤包括多发性硬化症、重症肌无力、亨廷顿氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化、格林巴利综合征、卒中后再灌注 (reperfusion following stroke)、退变性椎间盘、脑外伤、帕金森氏病、阿尔茨海默病、Miller-Fisher 综合征、脑外伤和/或出血、脱髓鞘和脑膜炎;

所述血液病包括败血症、严重败血症、败血症休克、败血症引起的急性呼吸窘迫综合征、全身炎症反应综合征、失血性休克、溶血性贫血、自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜和溶血性尿毒综合征;

所述泌尿生殖系统病症包括疼痛性膀胱病、感觉性膀胱病、慢性非细菌性膀胱炎、间质性膀胱炎、不孕症、胎盘功能障碍和流产和先兆子痫;

所述内分泌疾病包括桥本氏甲状腺炎、压力、焦虑和激素性疾病, 涉及垂体的催乳素、生长素或其他胰岛素样生长因子和促肾上腺皮质激素的调节性释放;

所述眼科疾病包括年龄相关性黄斑变性。

68. 权利要求 65 的用途, 其中所述药剂用于皮下给药、胃肠外给药和/或静脉给药。

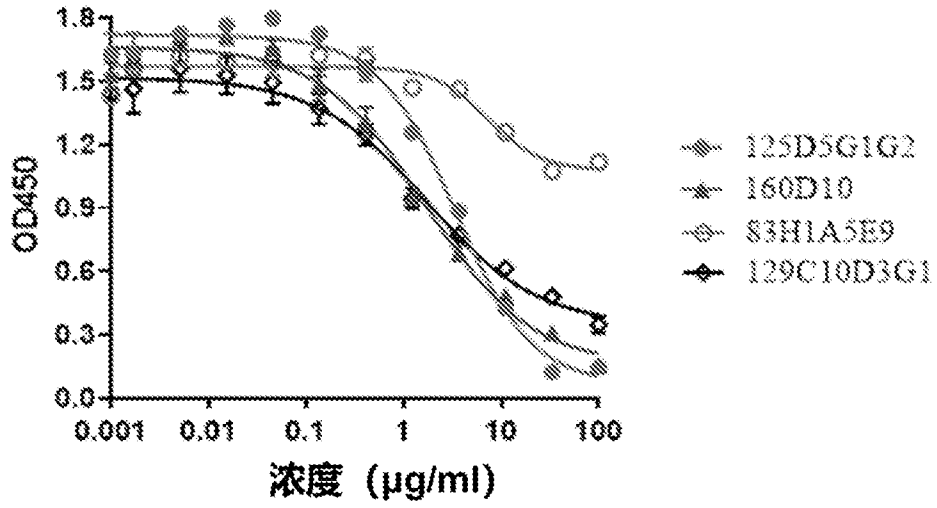


图 1

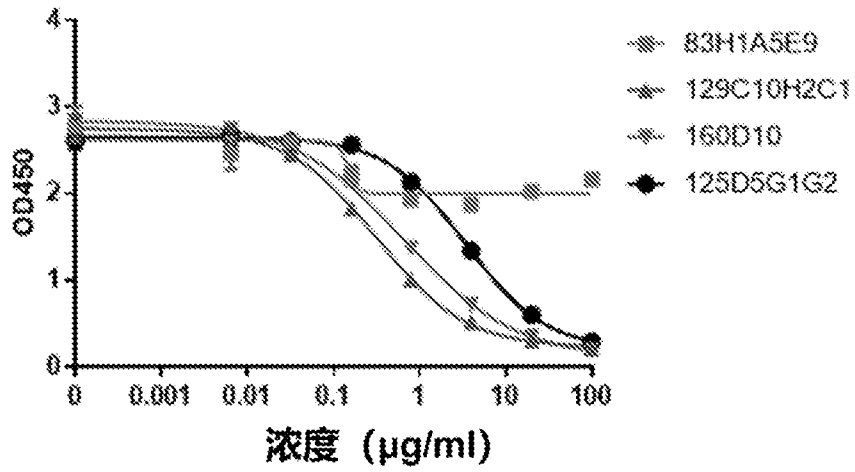


图 2

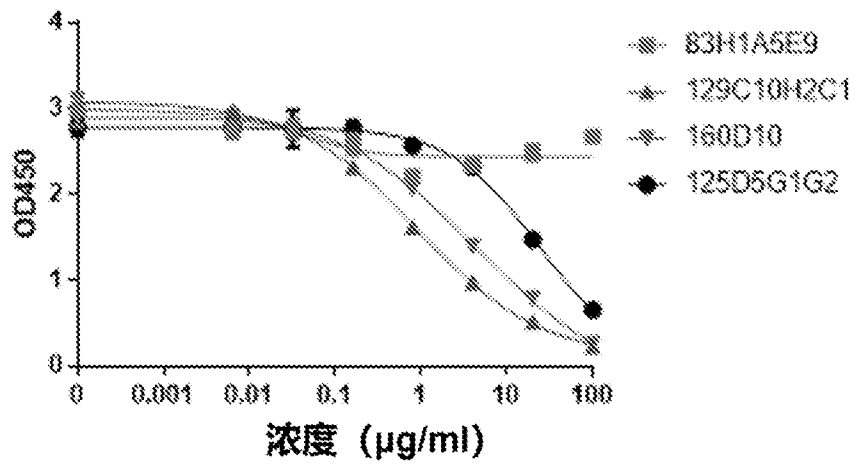


图 3

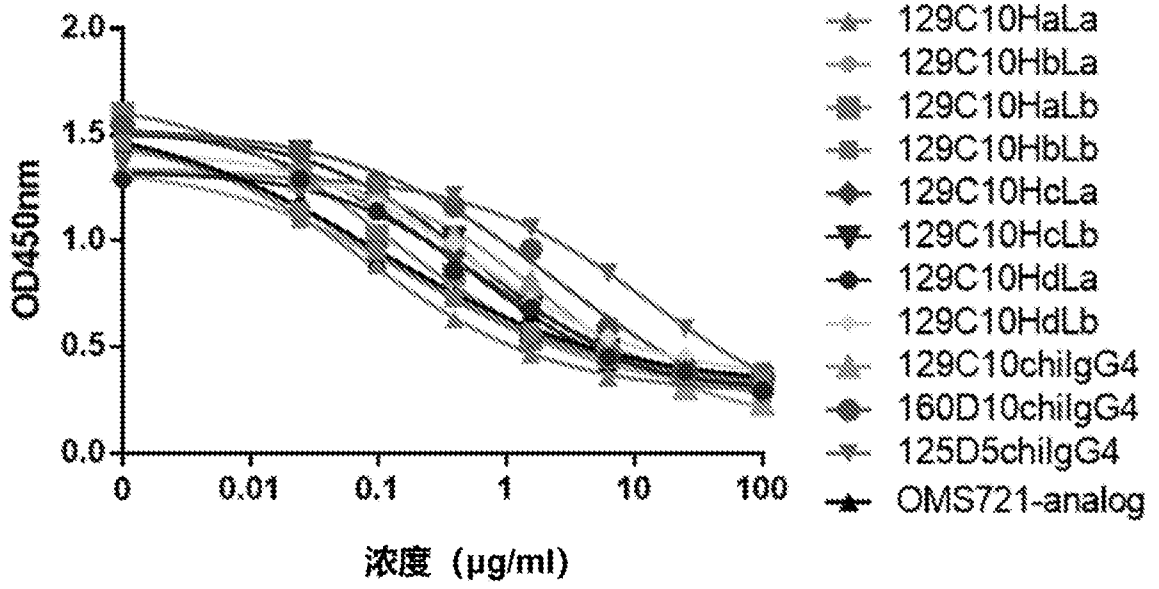
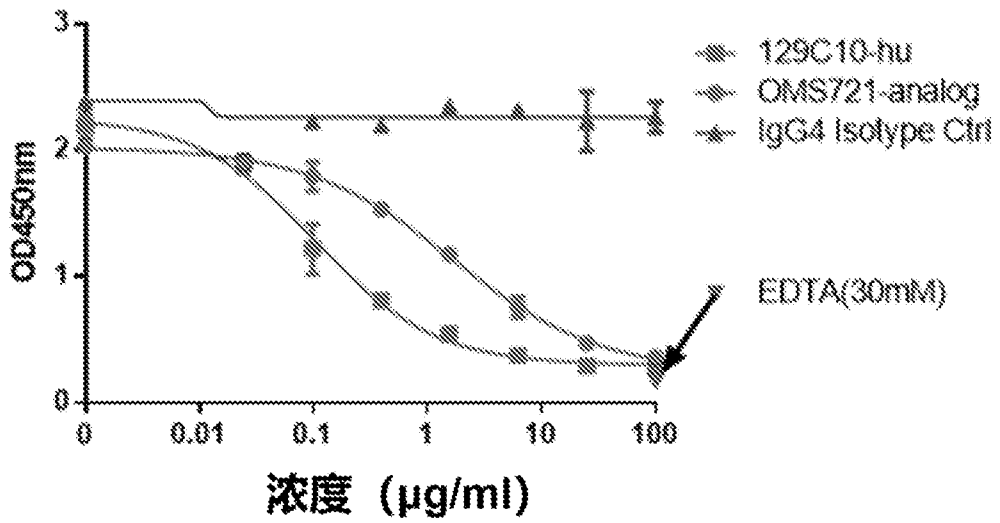


图 4



	129C10-hu	OMS721-analog
IC50	0.1050	1.703

图 5

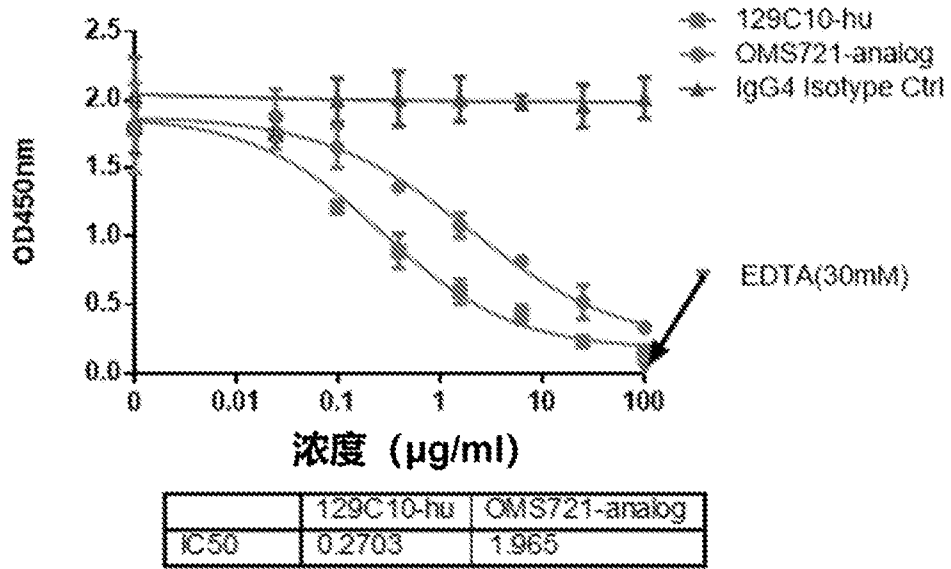


图 6

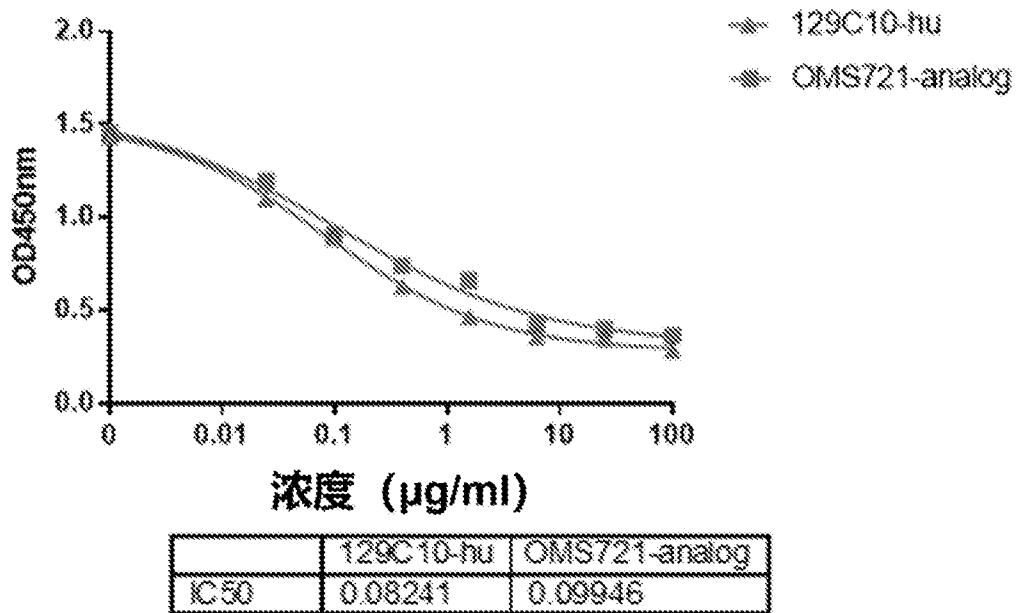


图 7

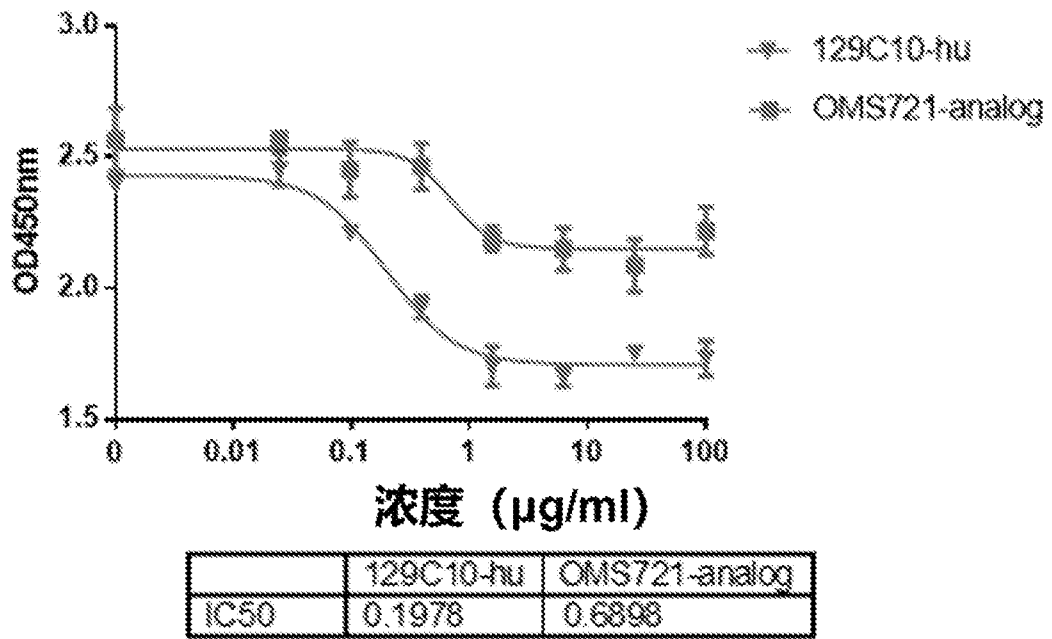


图 8

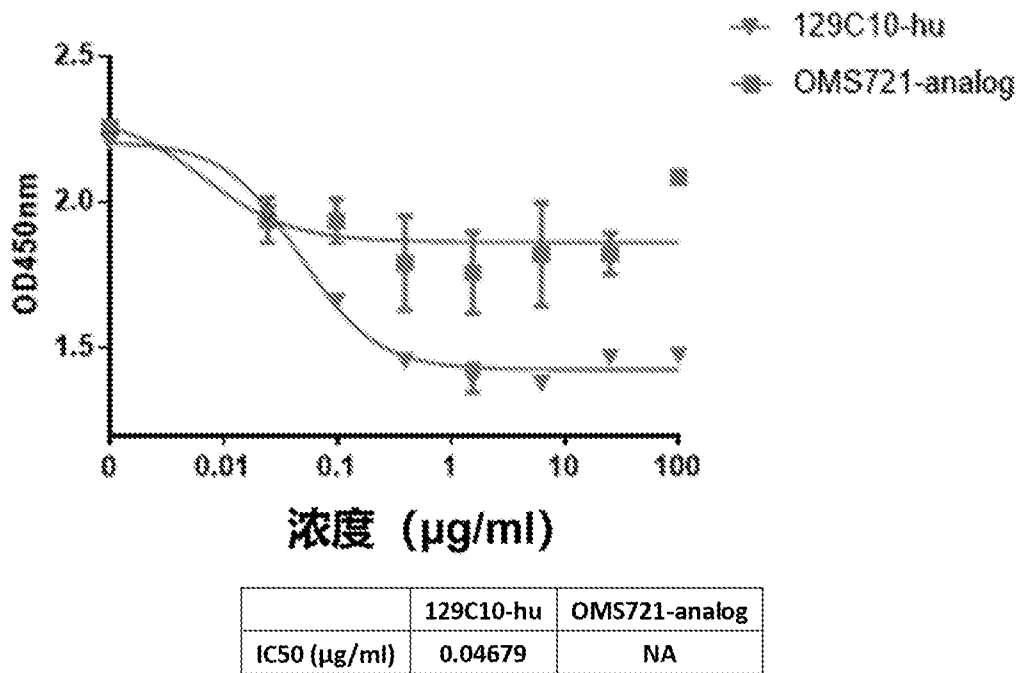
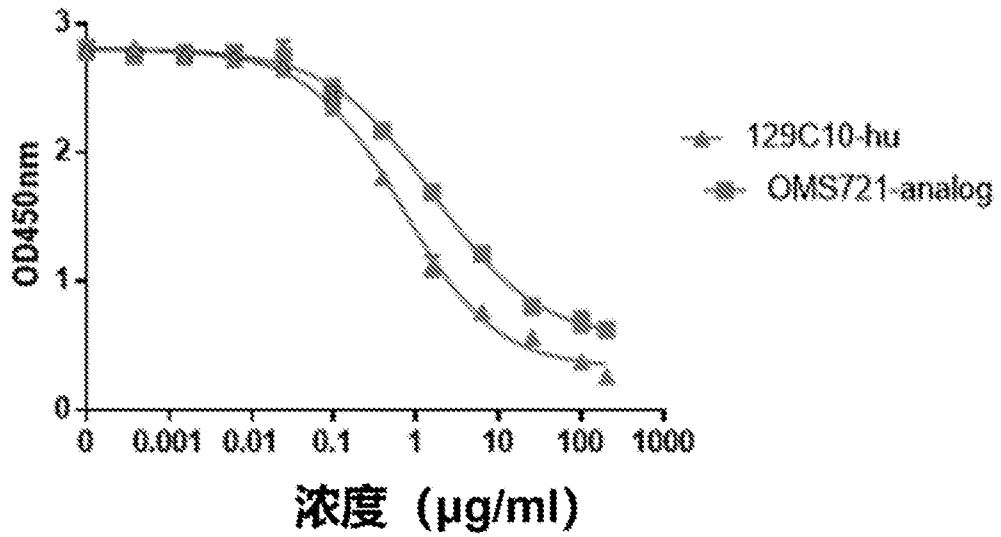


图 9



	129C10-hu	OMS721-analog
IC50	0.6851	1.588

图 10

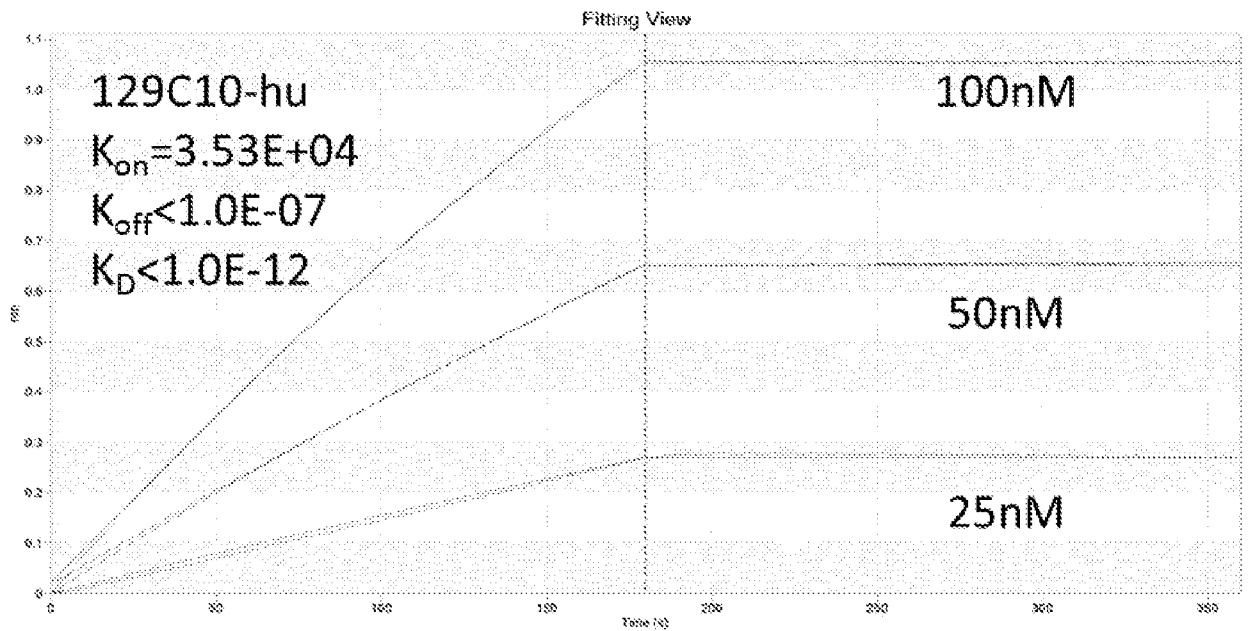


图 11

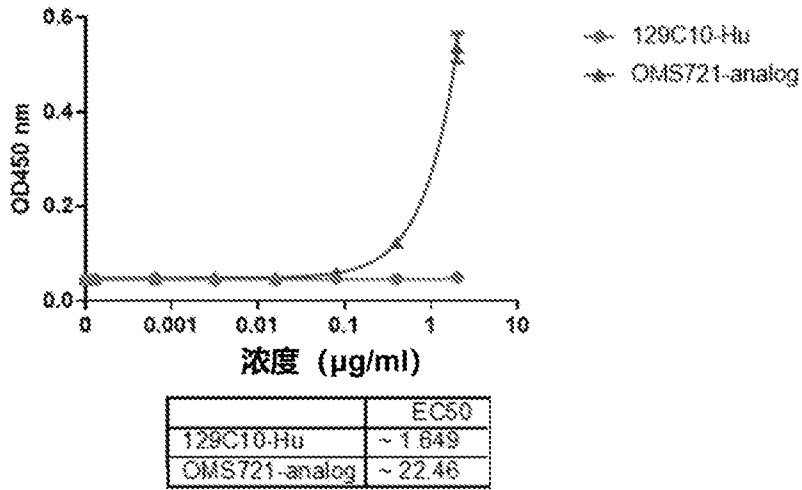


图 12A

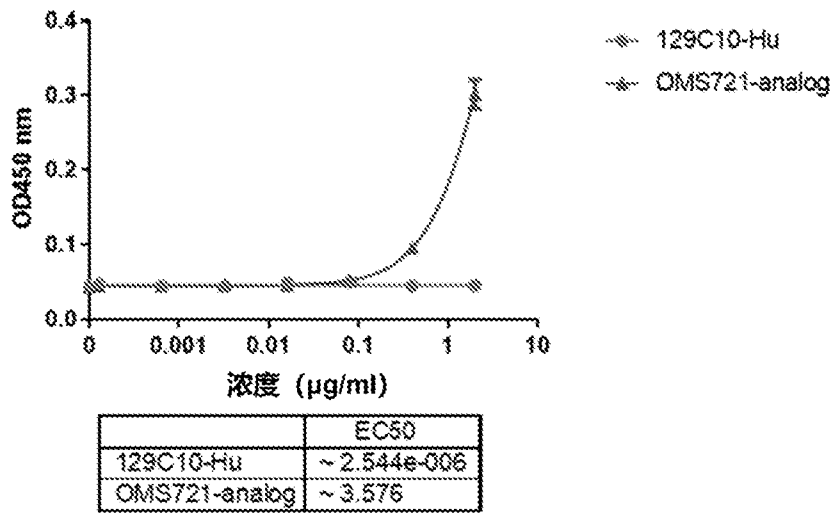


图 12B

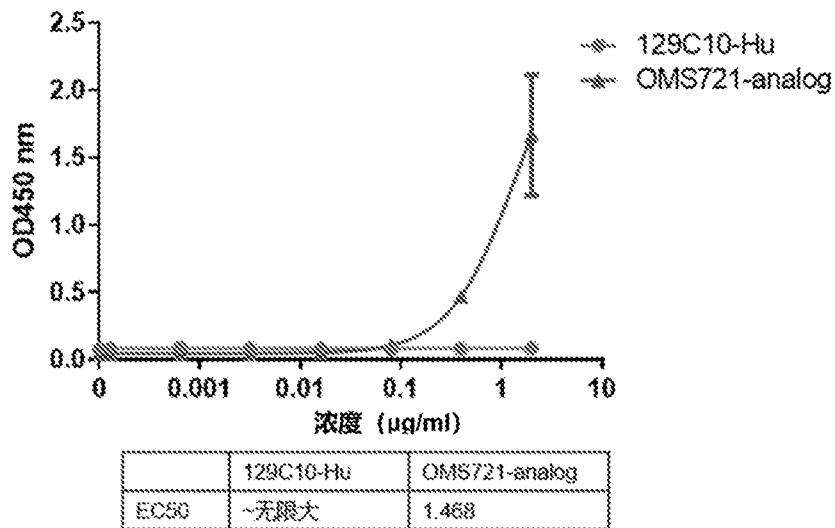
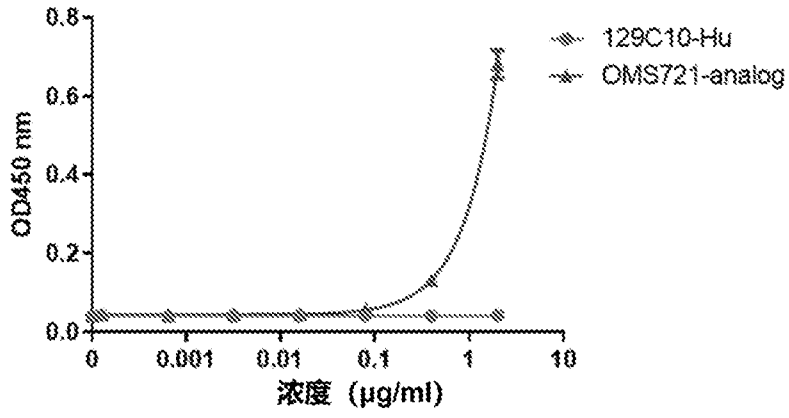
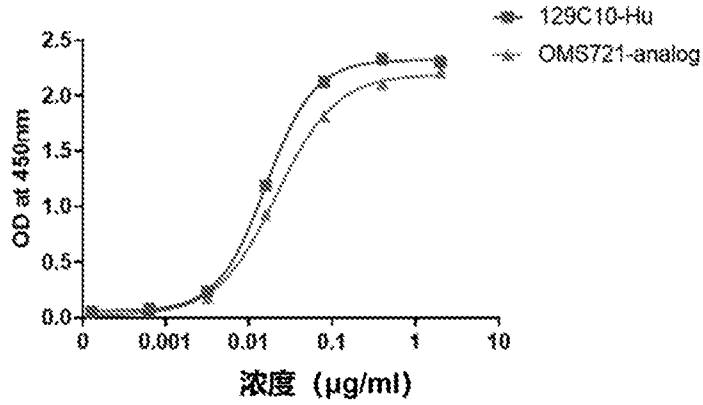


图 12C



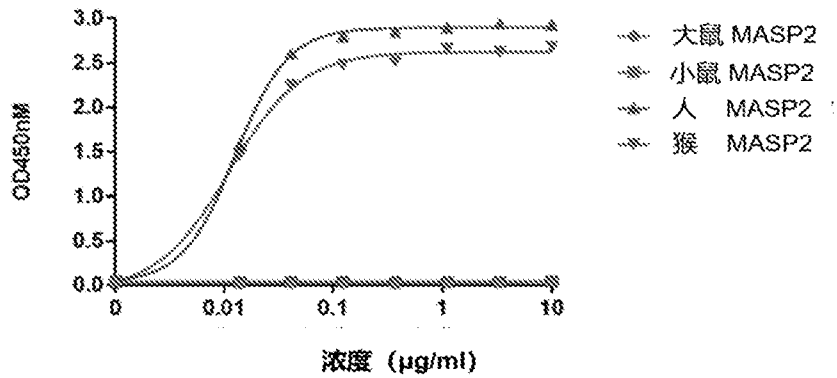
	129C10-Hu	OMS721-analog
EC50	~无限大	73.66

图 12D



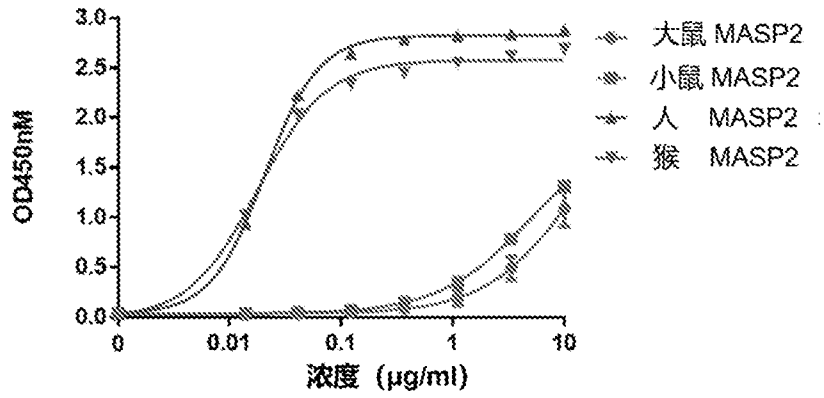
	129C10-Hu	OMS721-analog
EC50	0.01616	0.02166

图 12E



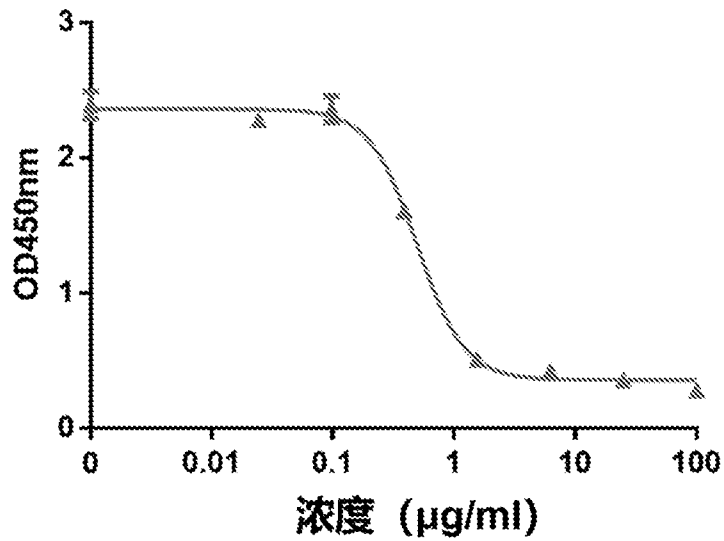
	EC50
大鼠 MASP2	17.2
小鼠 MASP2	~672
人 MASP2	0.01266
猴 MASP2	0.01111

图 13A



	EC50
大鼠 MASP2	12.33
小鼠 MASP2	4.912
人 MASP2	0.0208
猴 MASP2	0.0181

图 13B



IC50	0.4973
------	--------

图 14

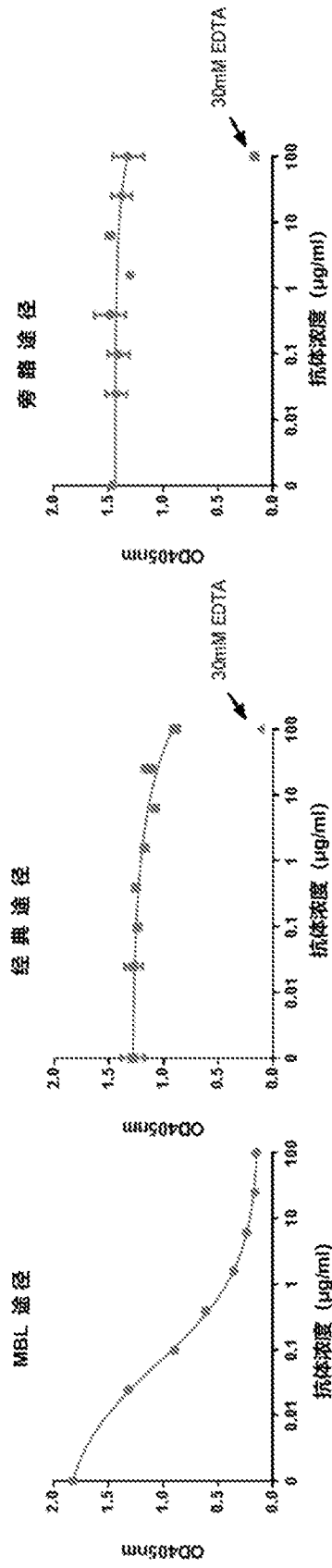


图 15

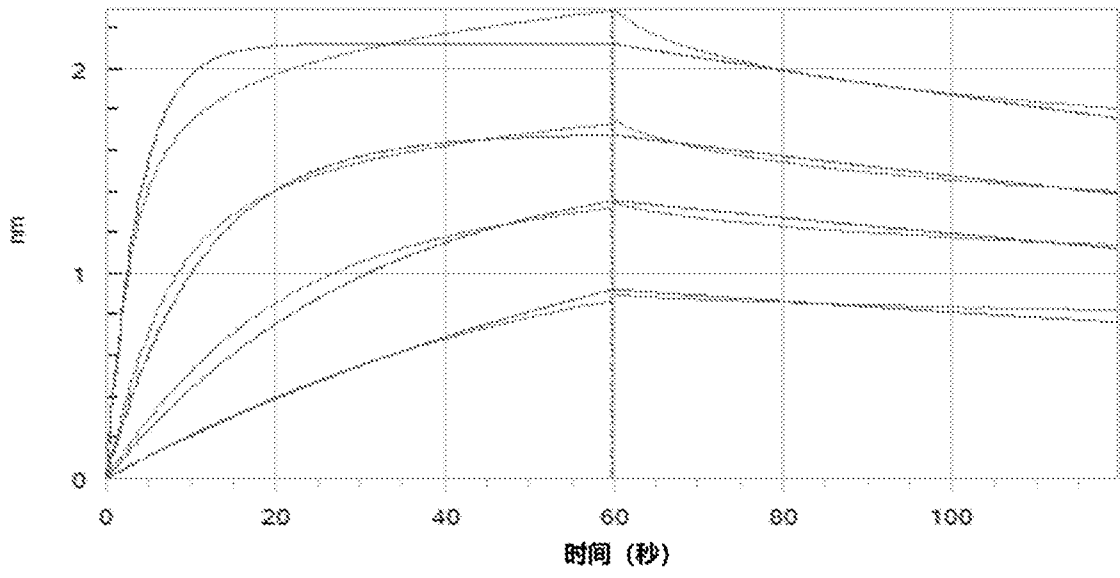


图 16A

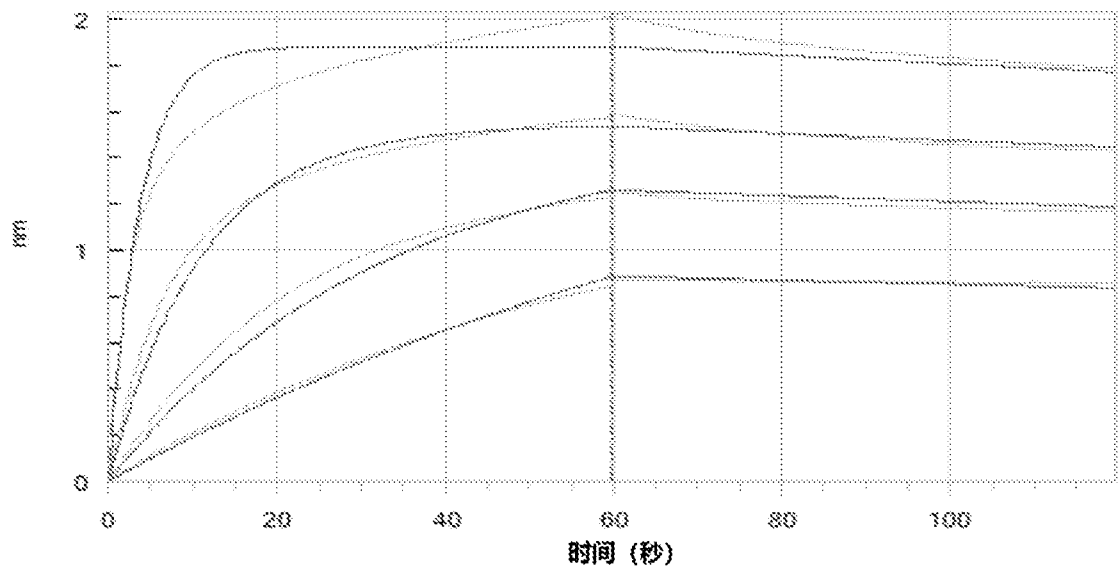


图 16B

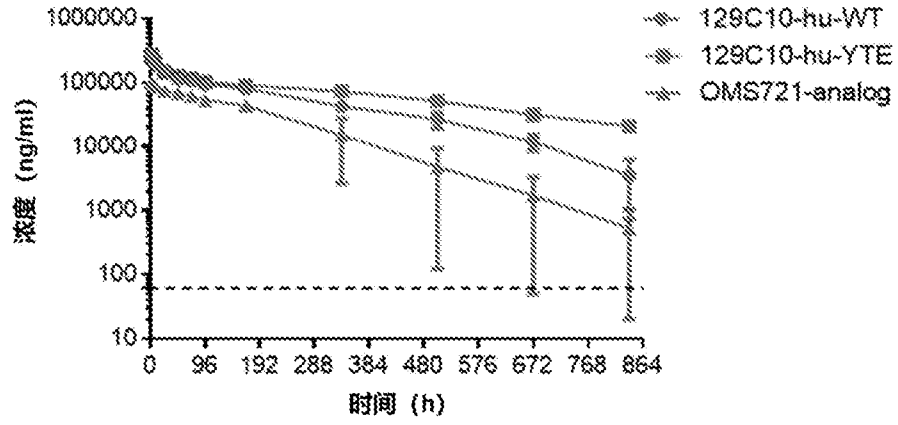


图 17

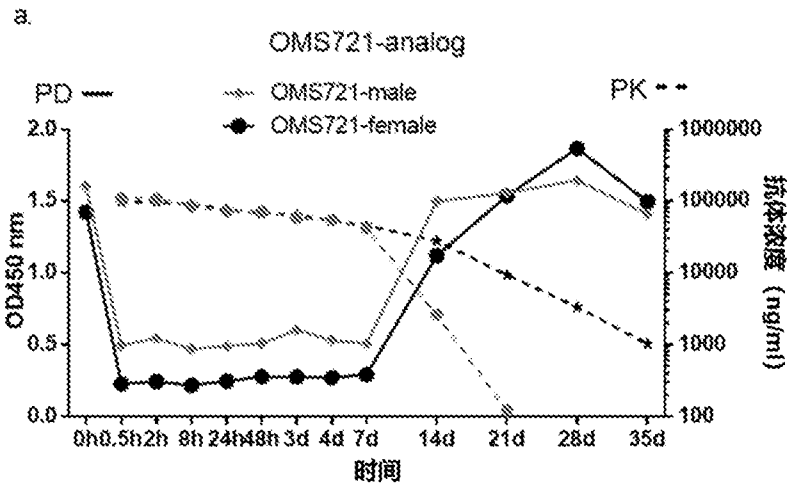


图 18A

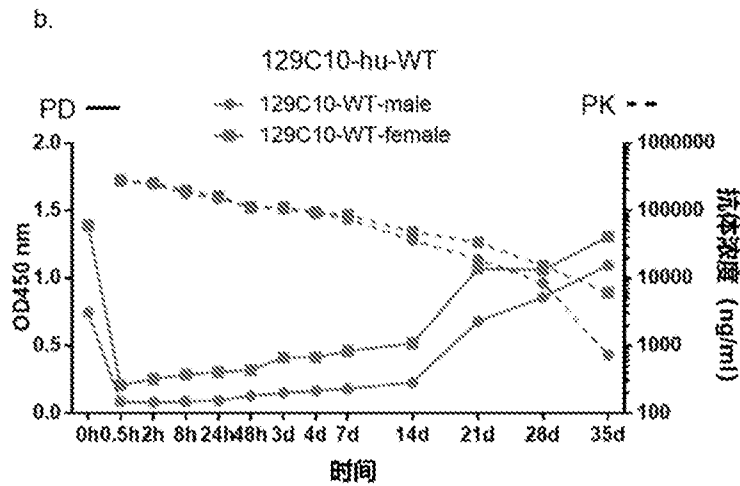


图 18B

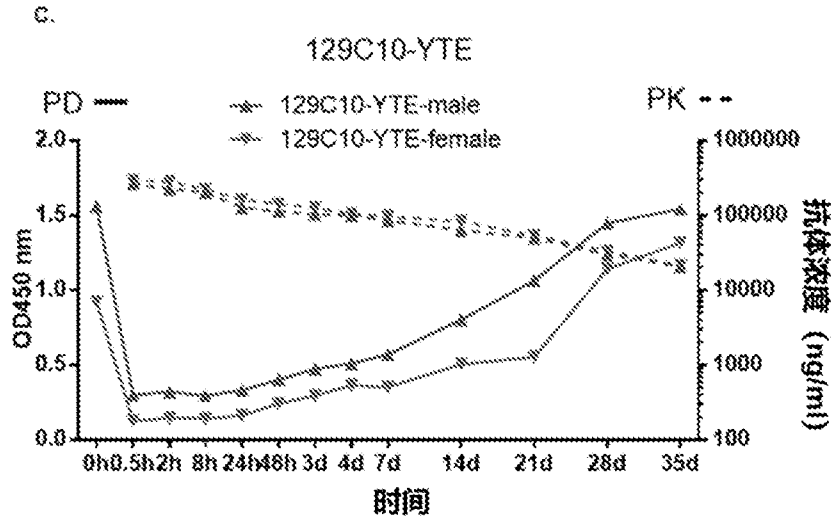


图 18C

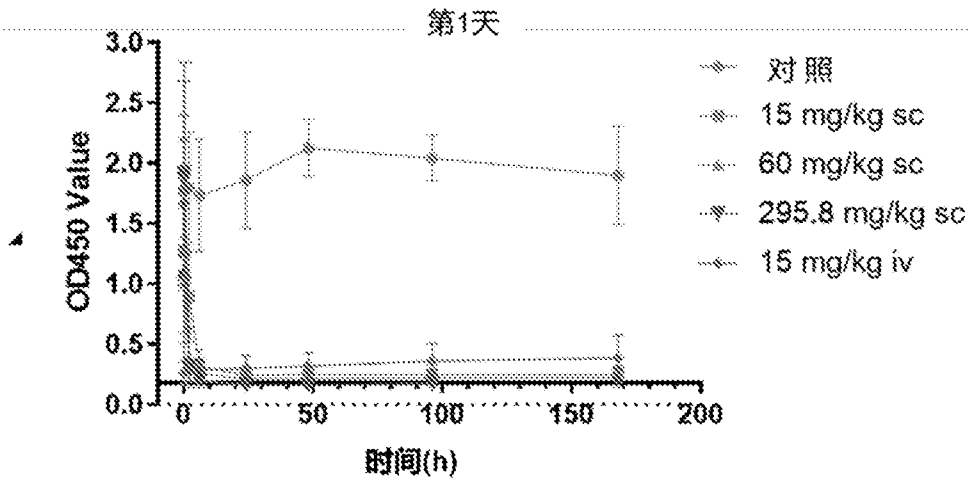


图 19

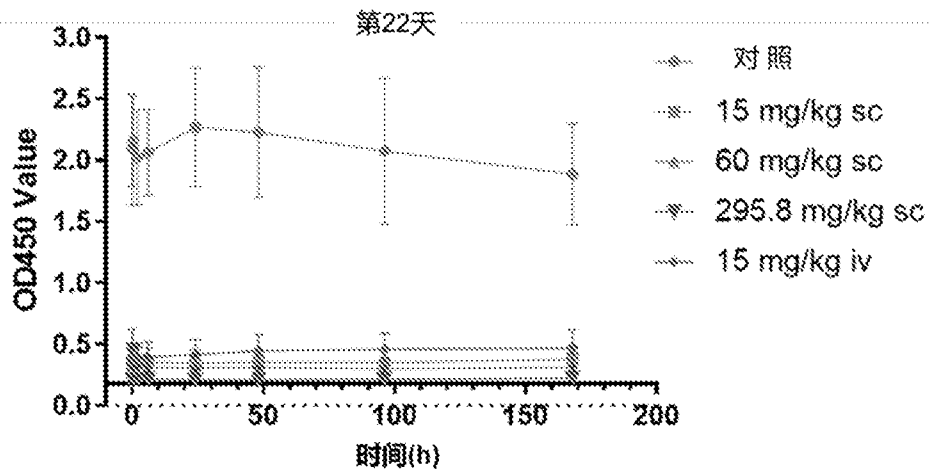


图 20

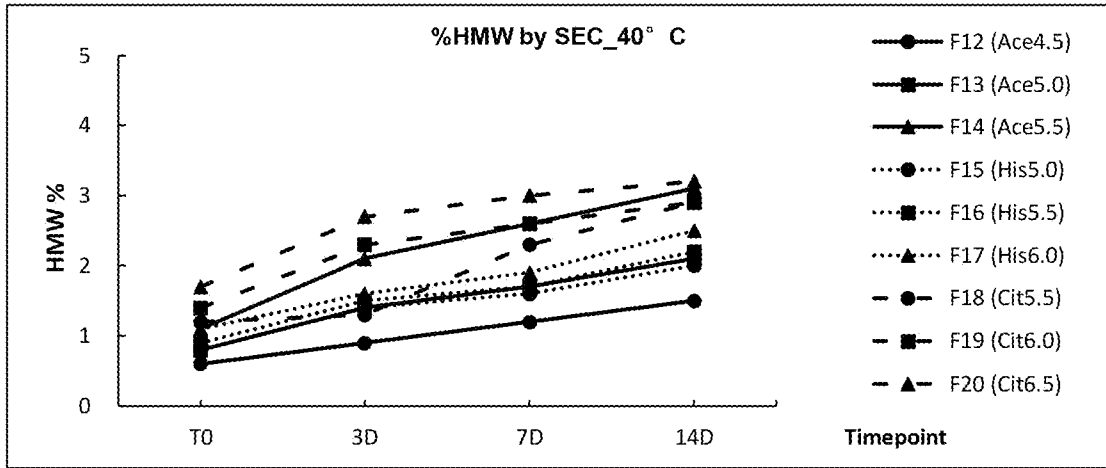


图 21

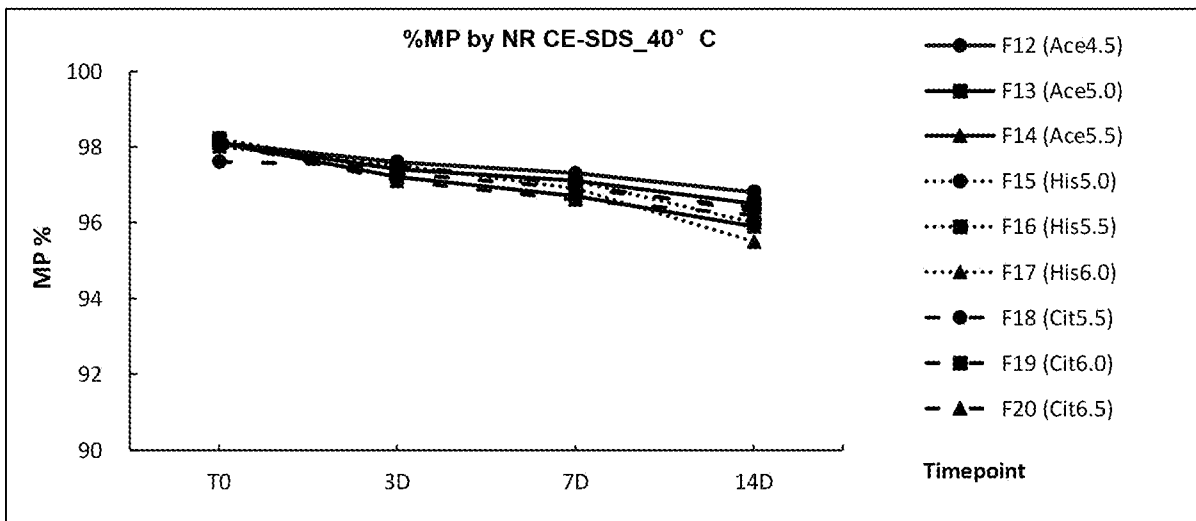
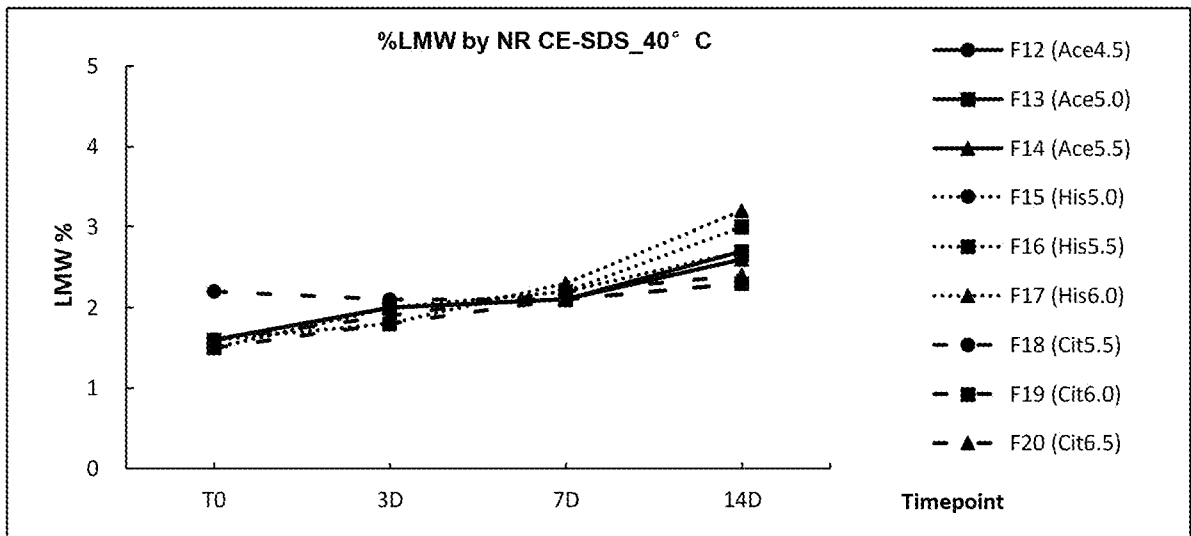


图 22

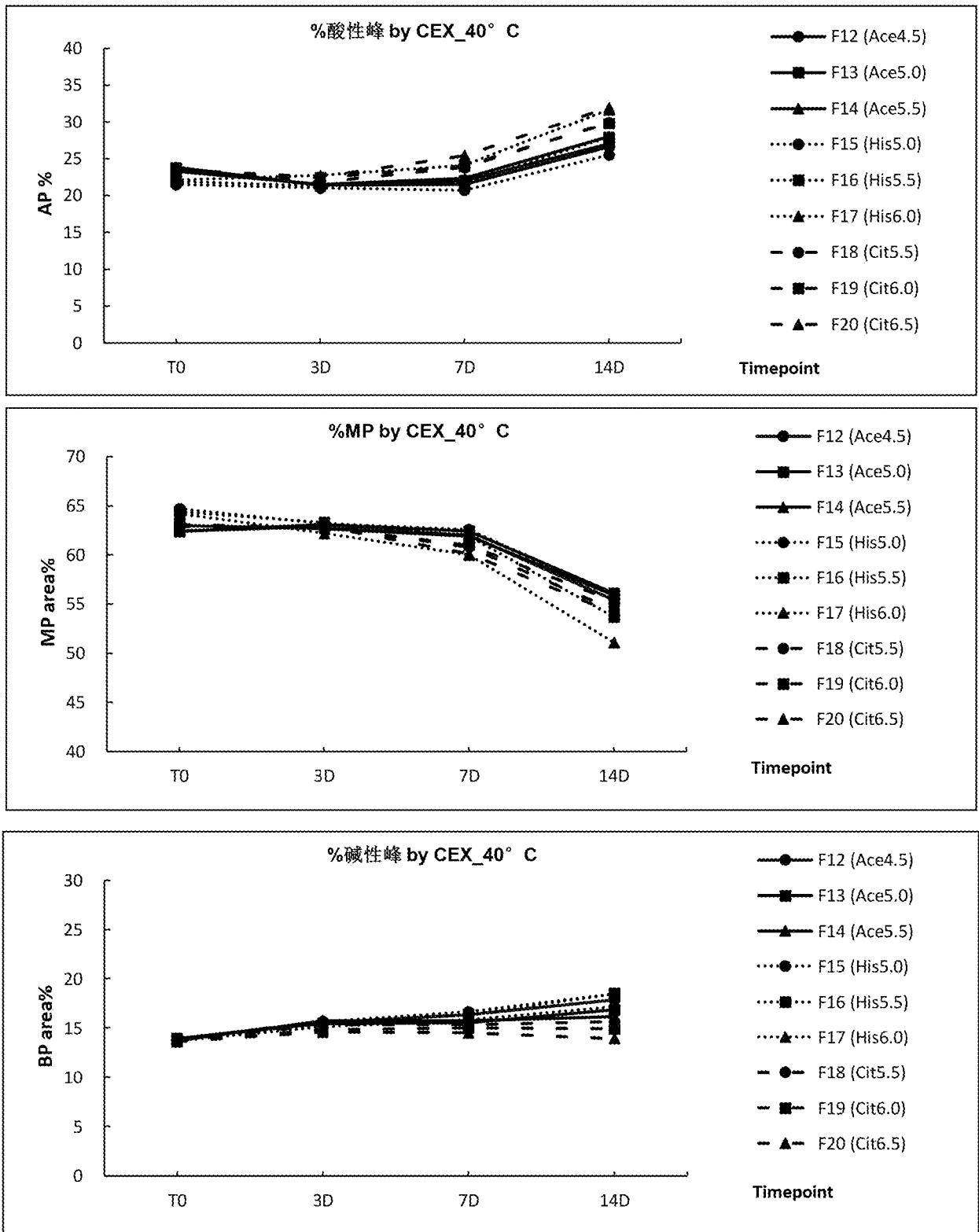


图 23

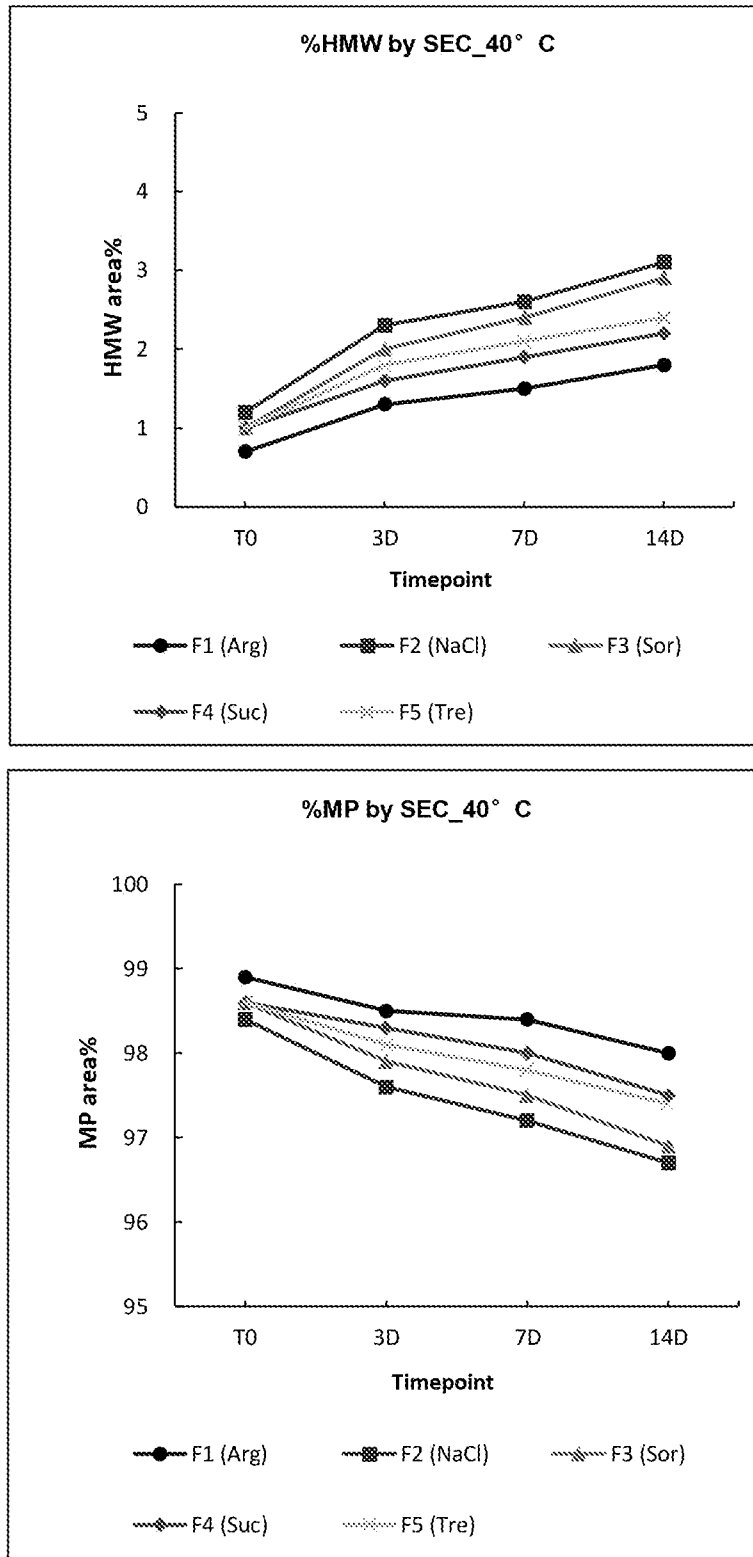


图 24

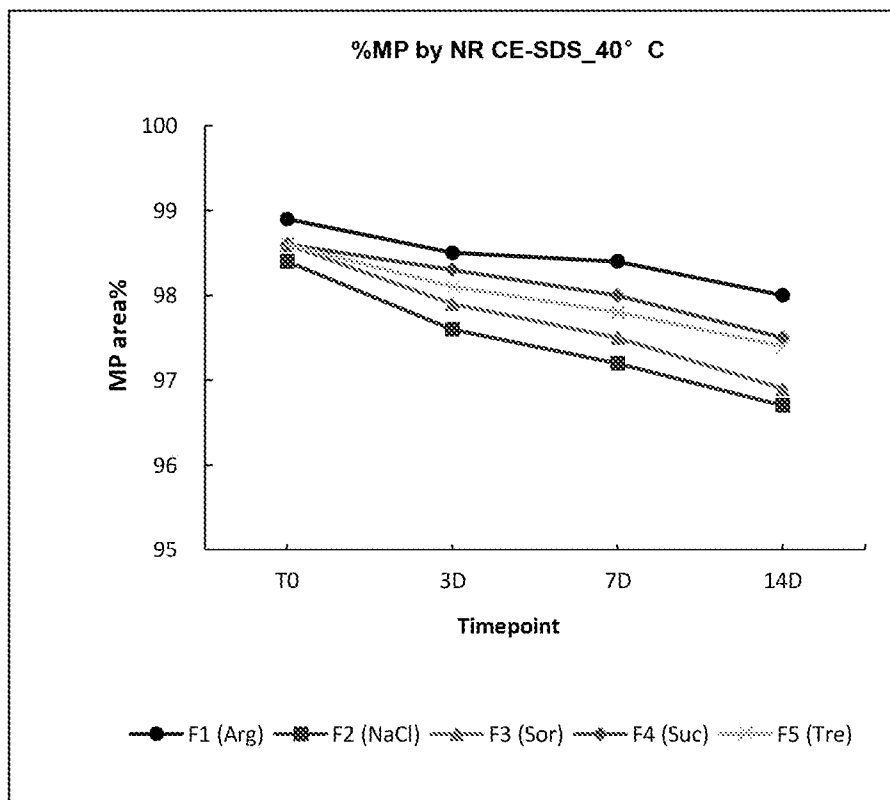
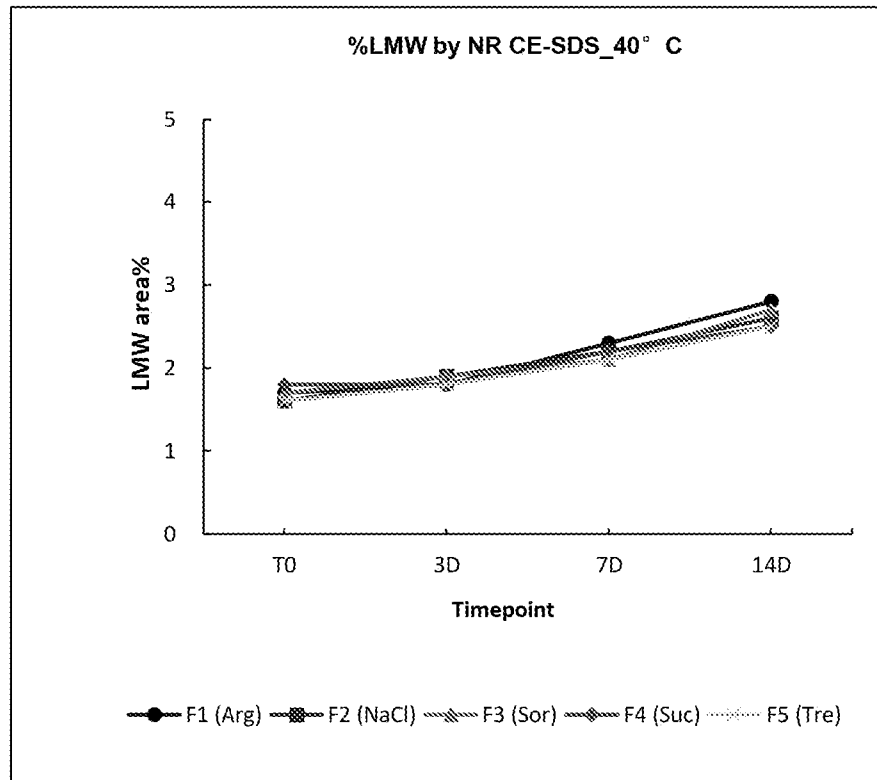


图 25

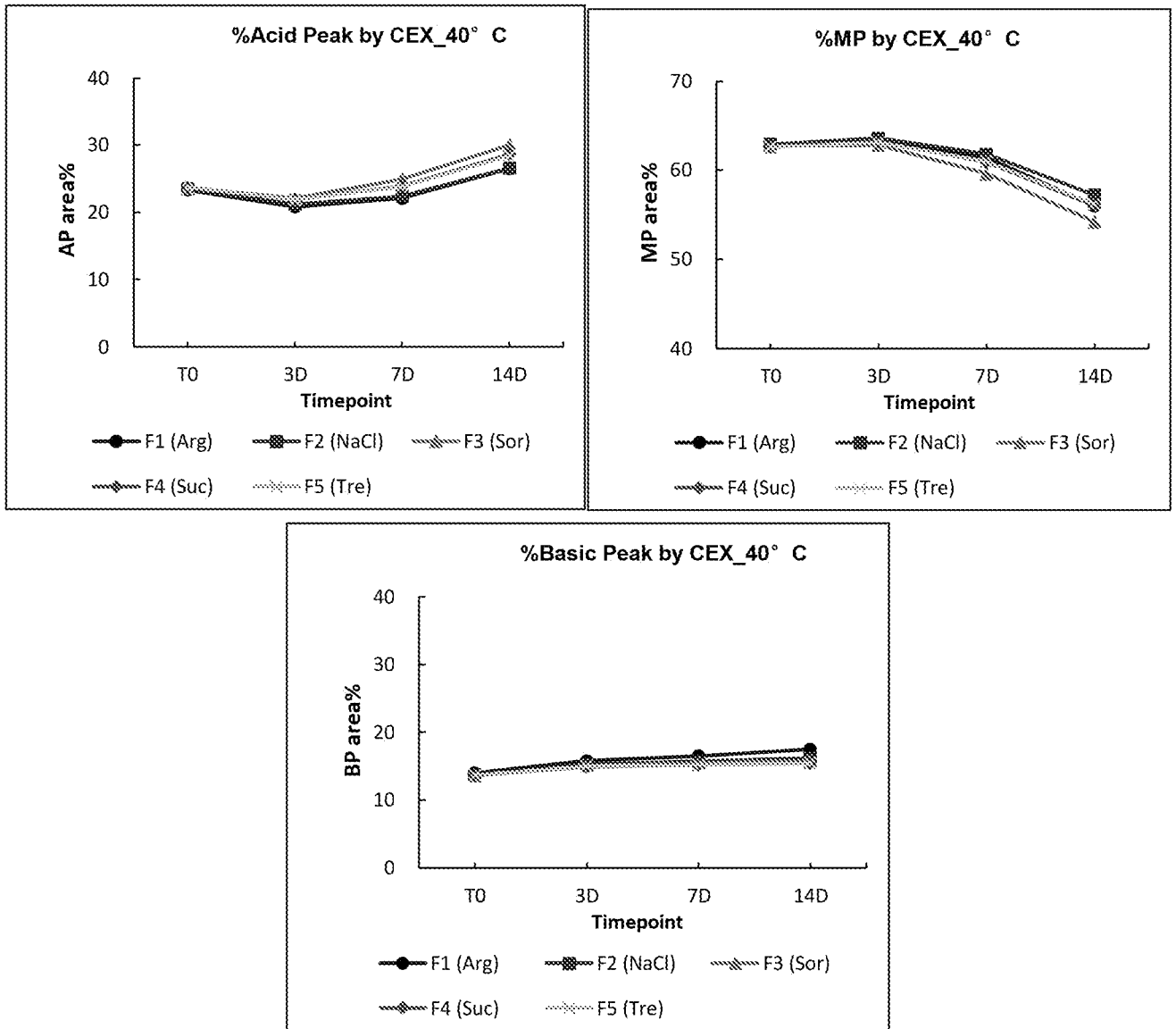


图 26

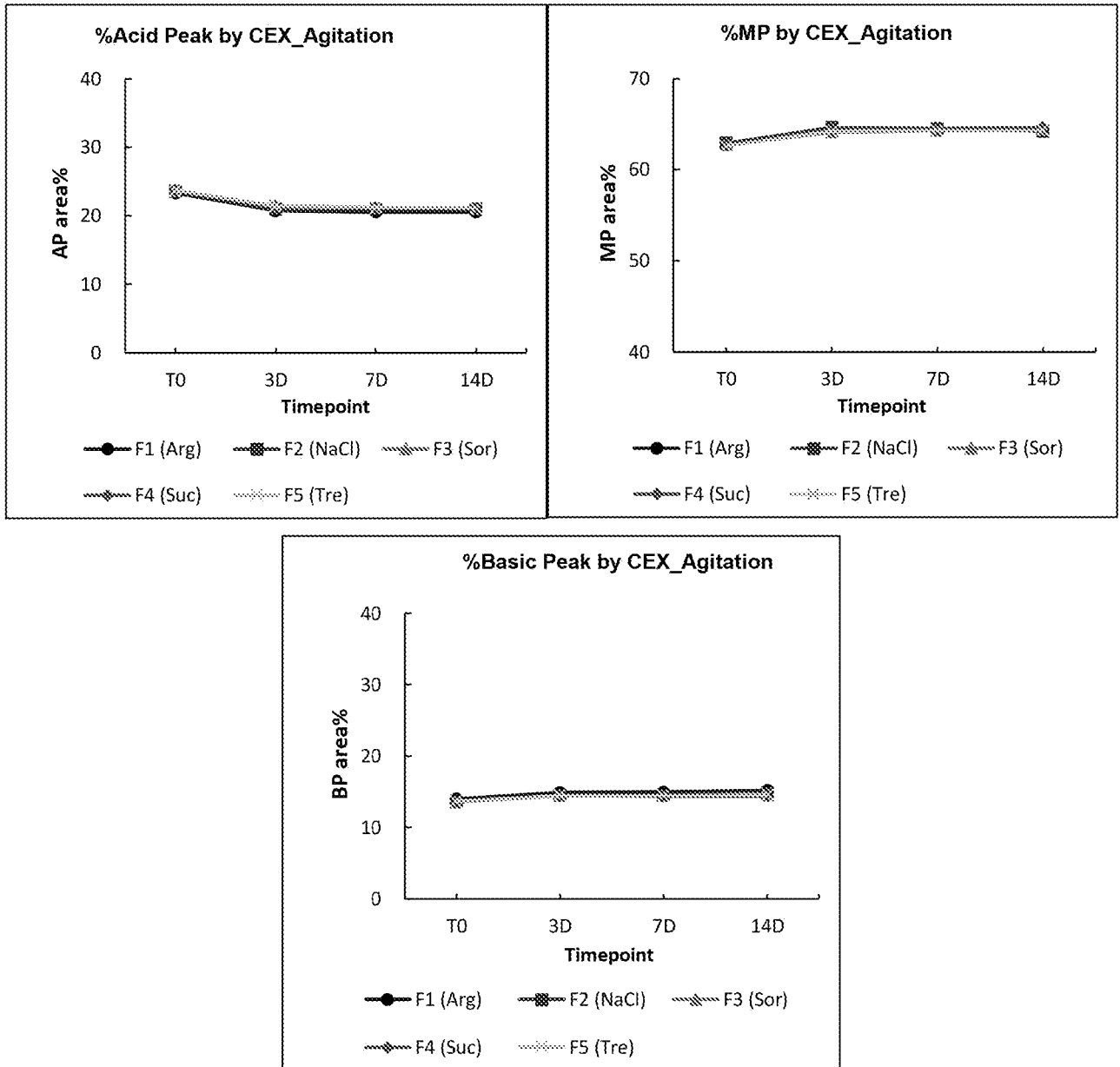


图 27

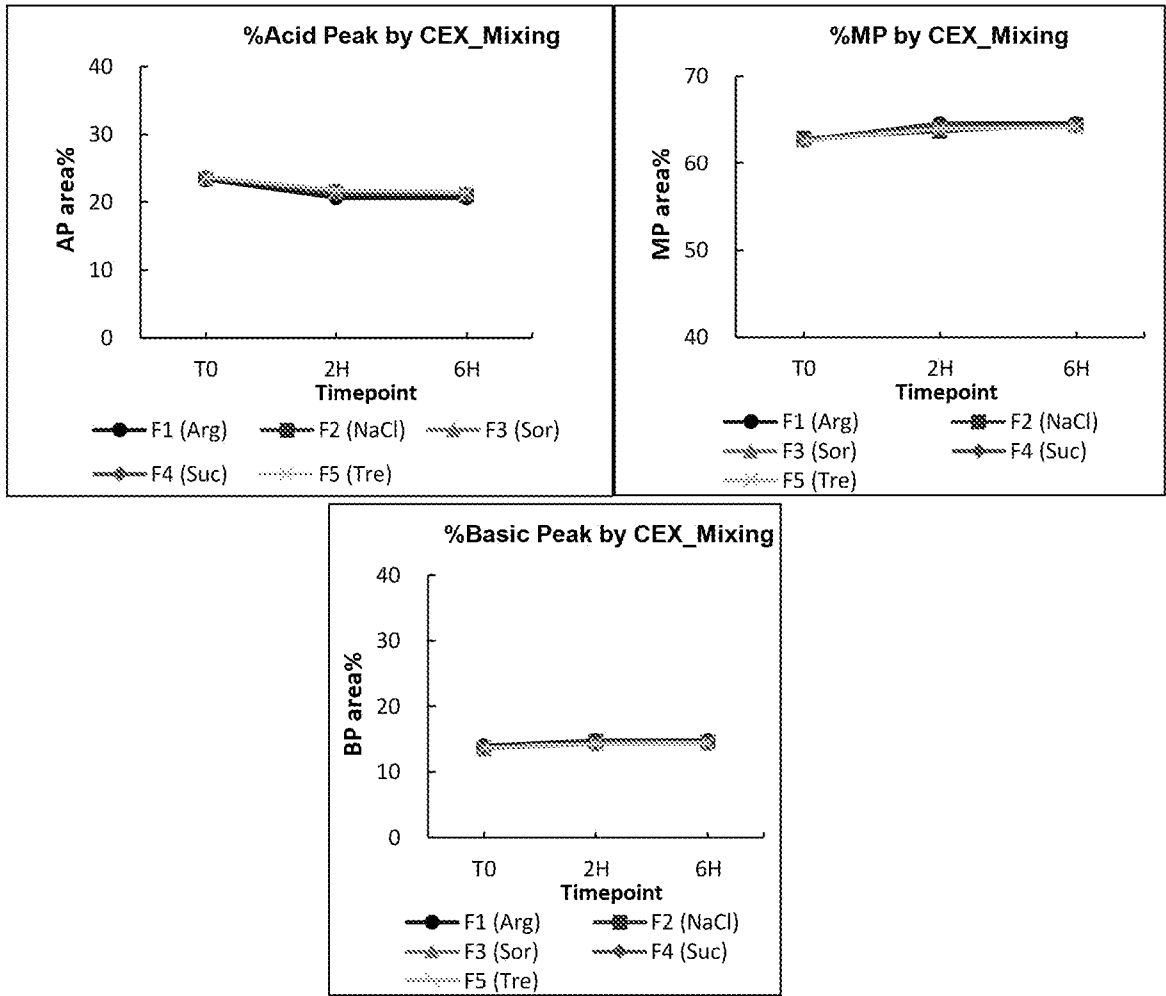


图 28

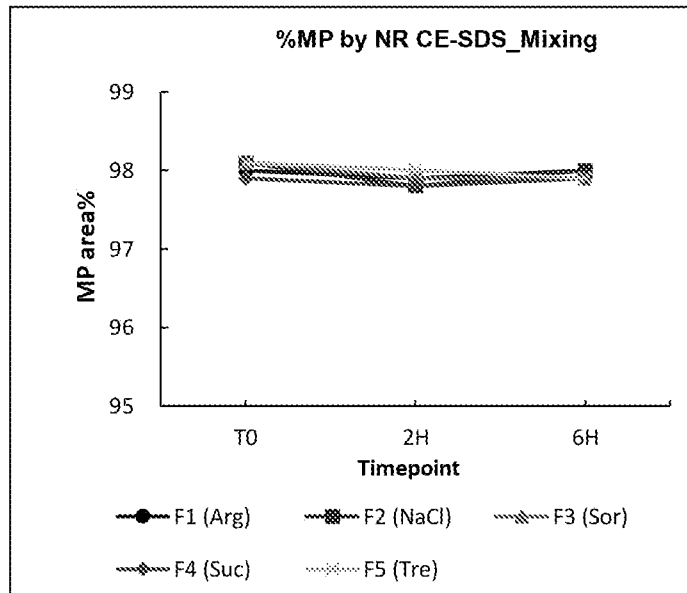
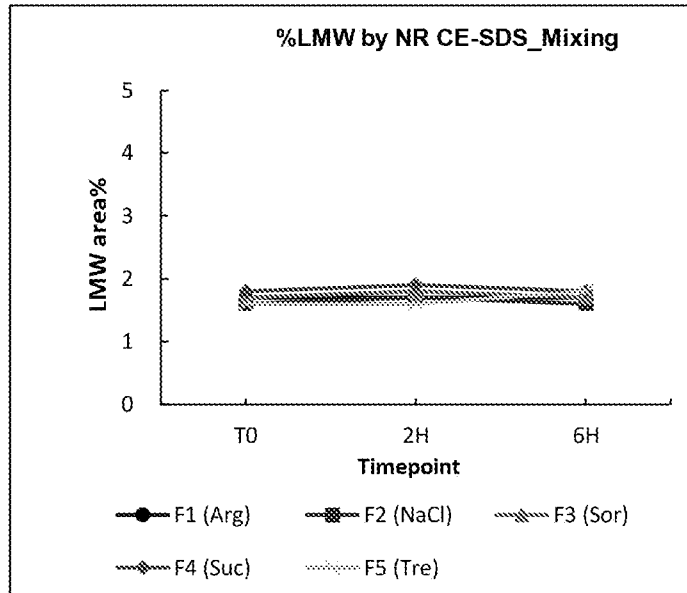


图 29

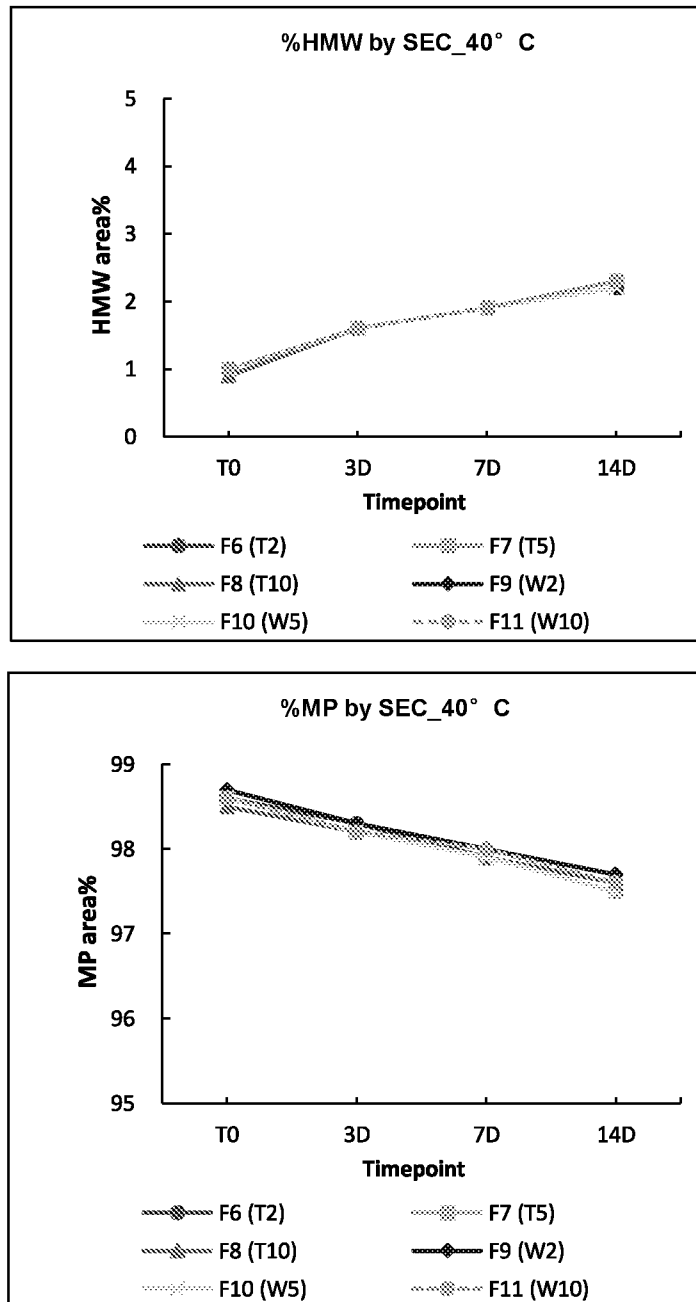


图 30

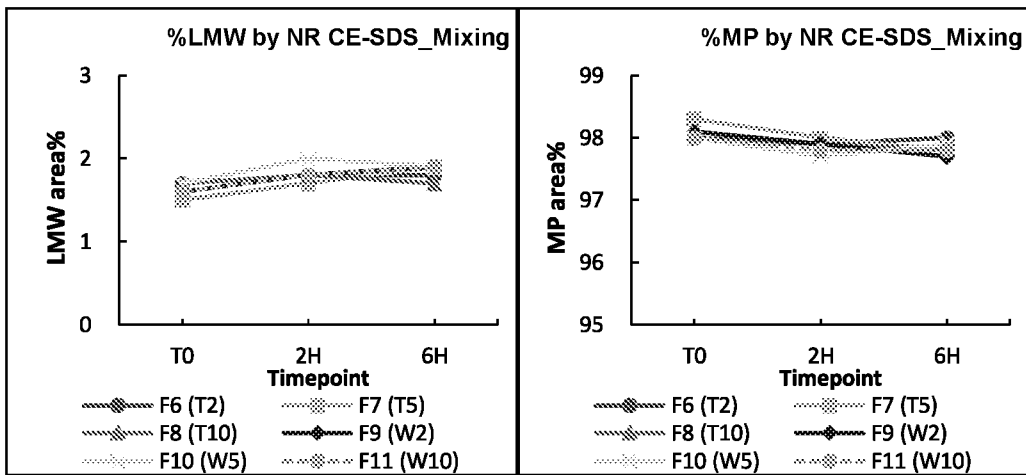


图 31

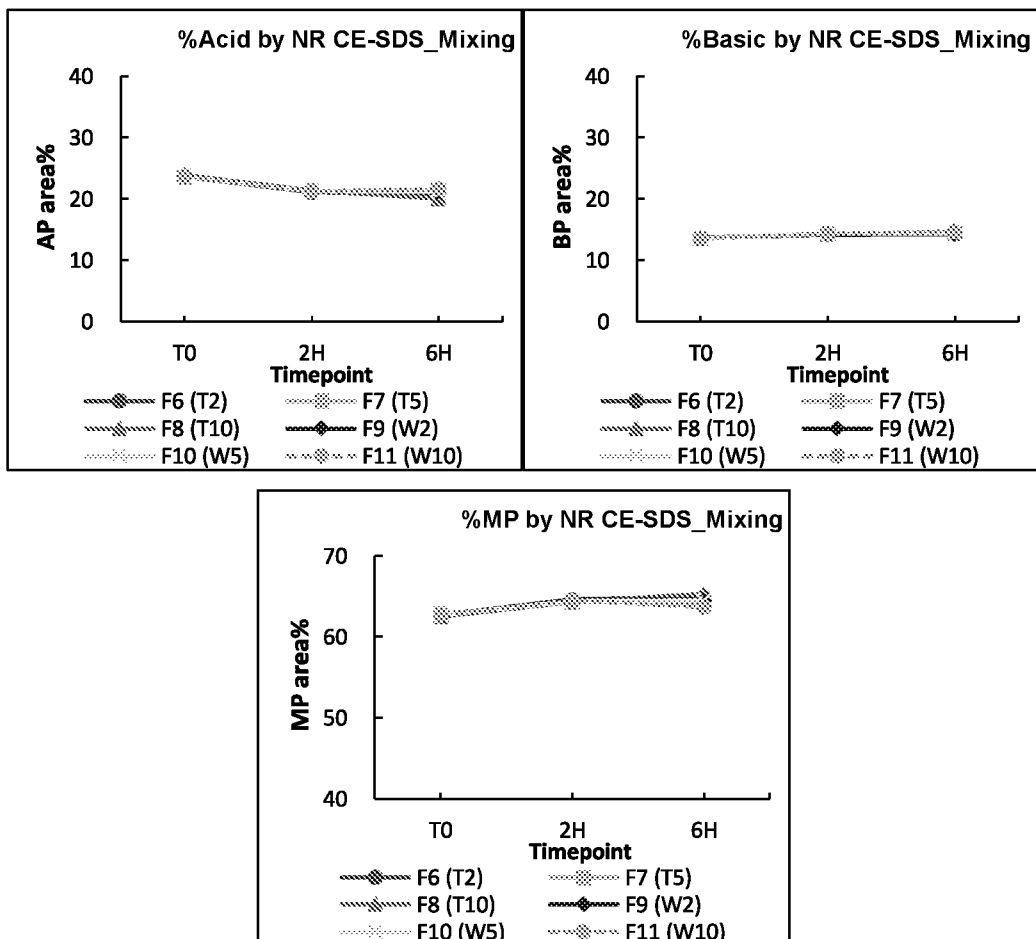


图 32

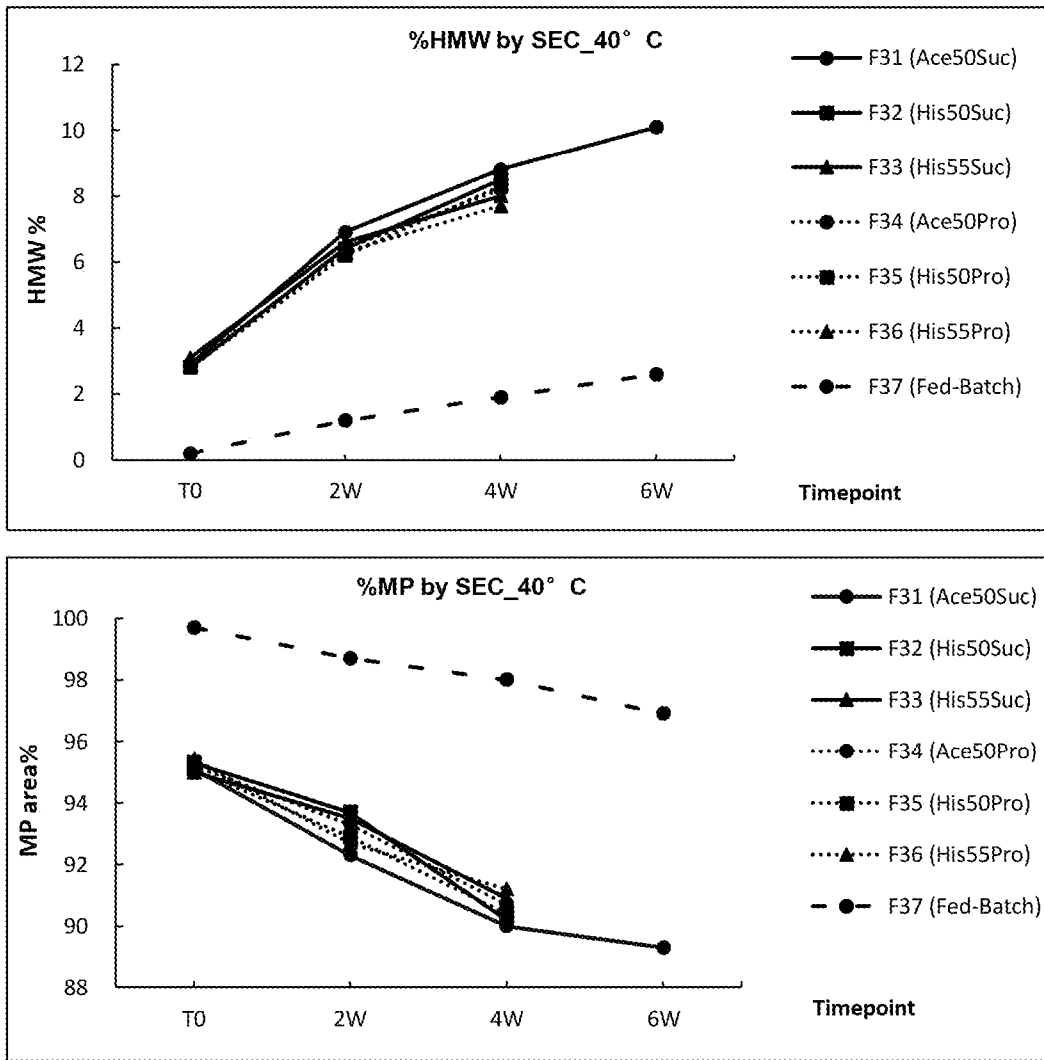


图 33

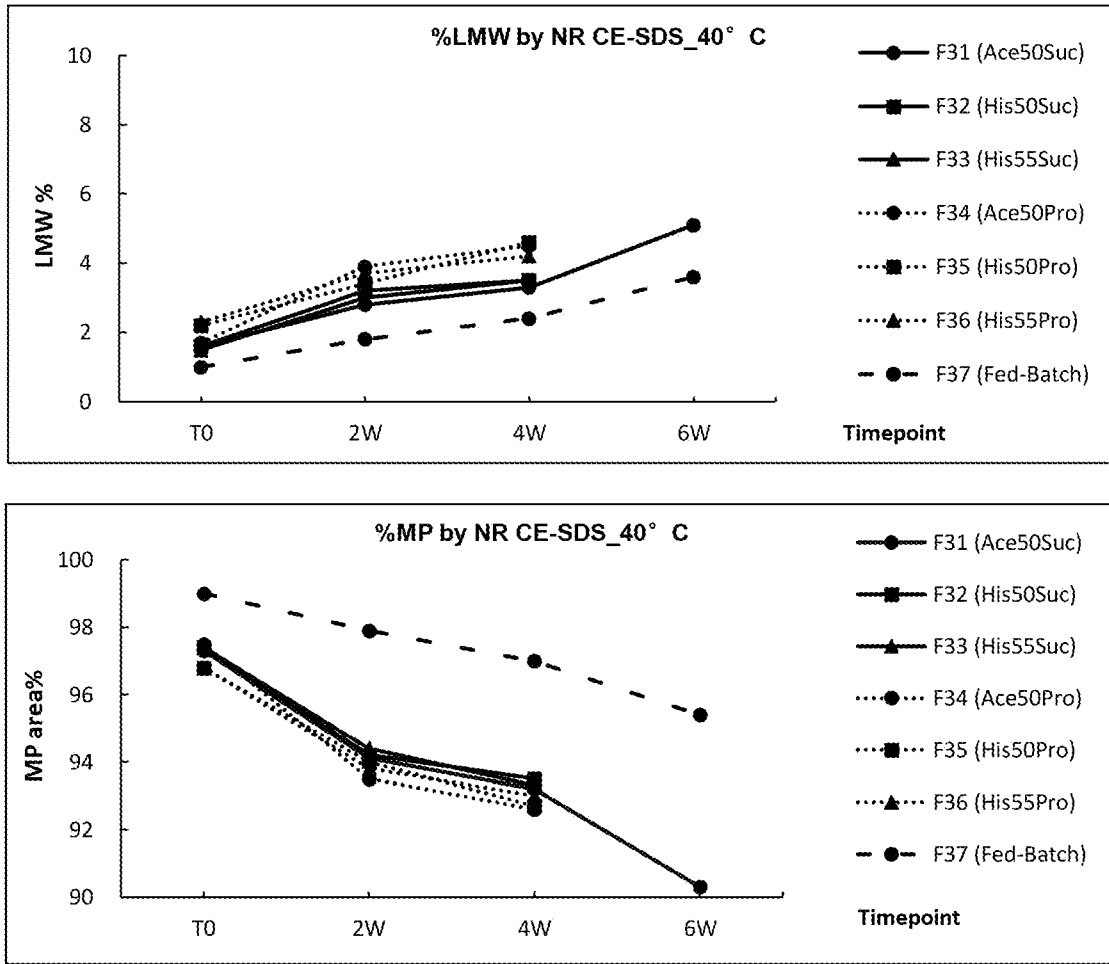


图 34

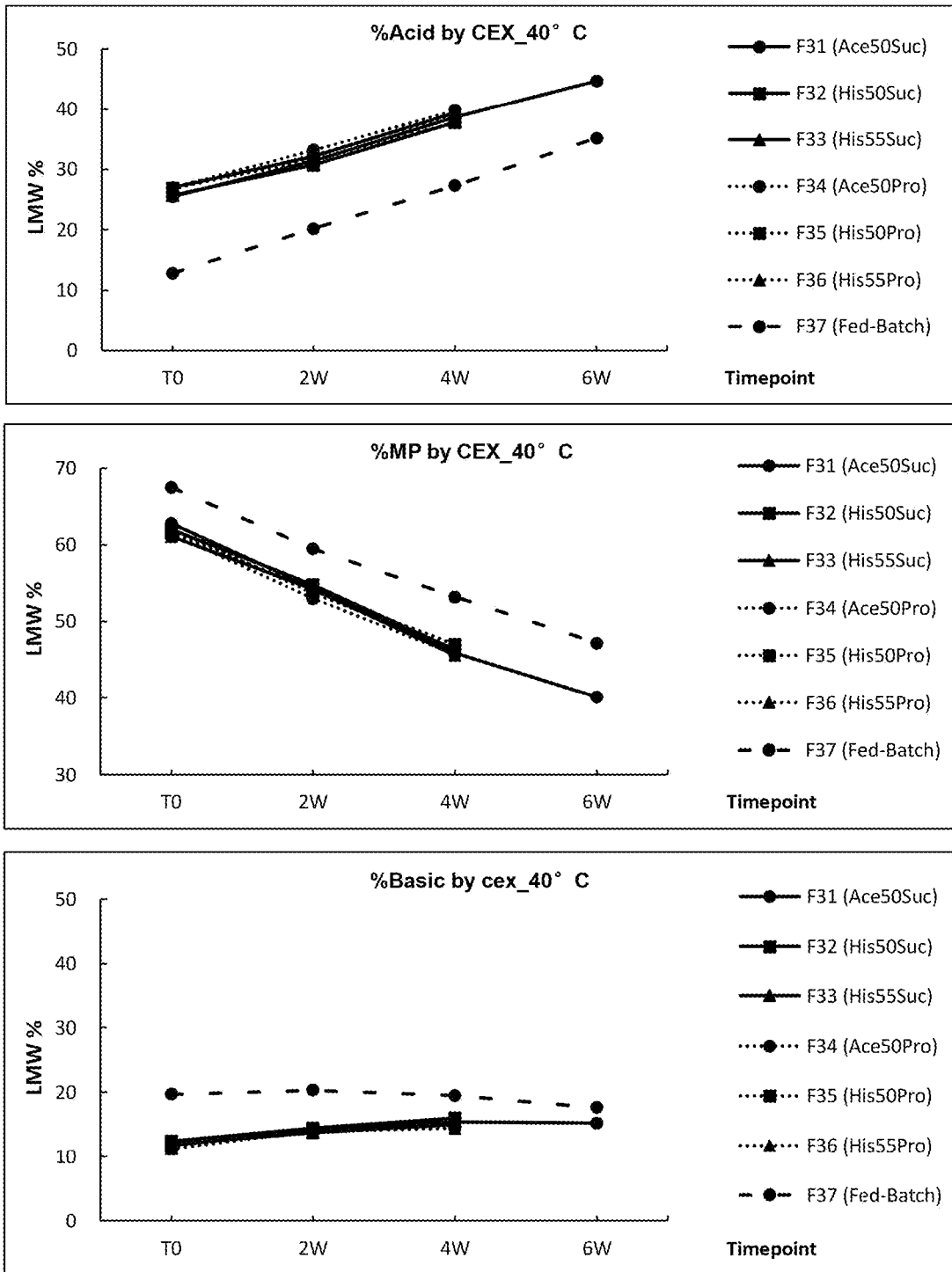


图 35

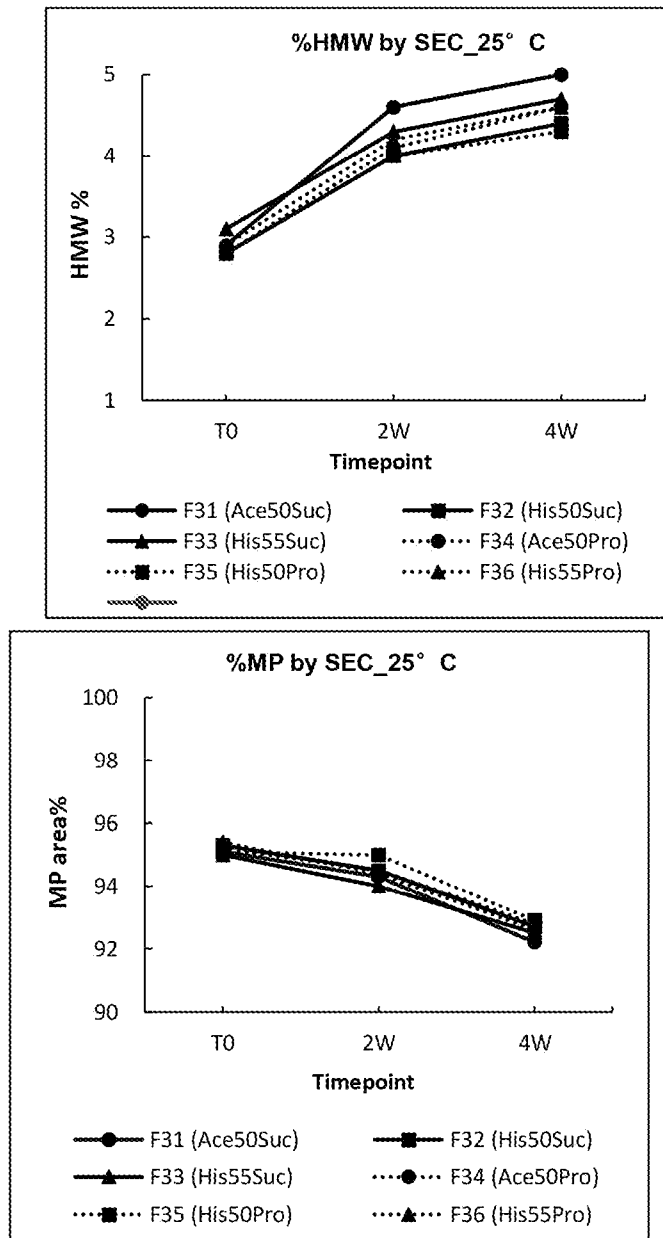


图 36

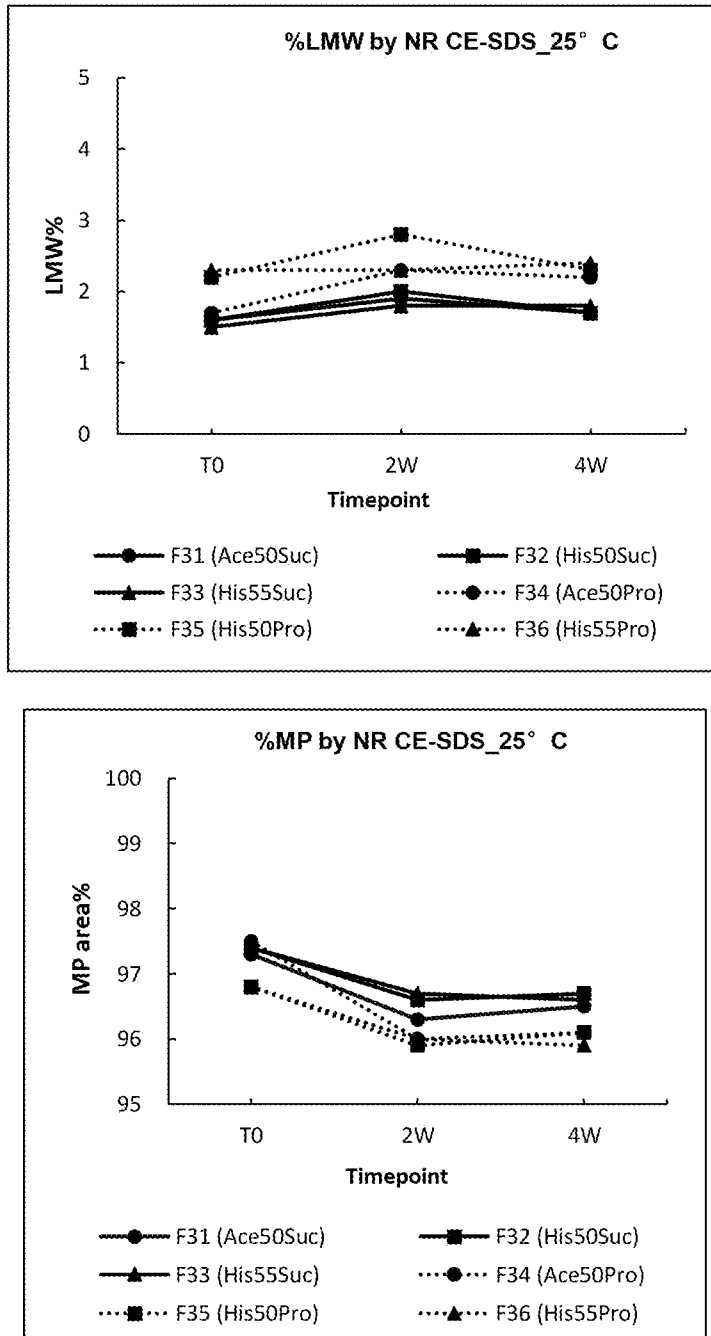


图 37

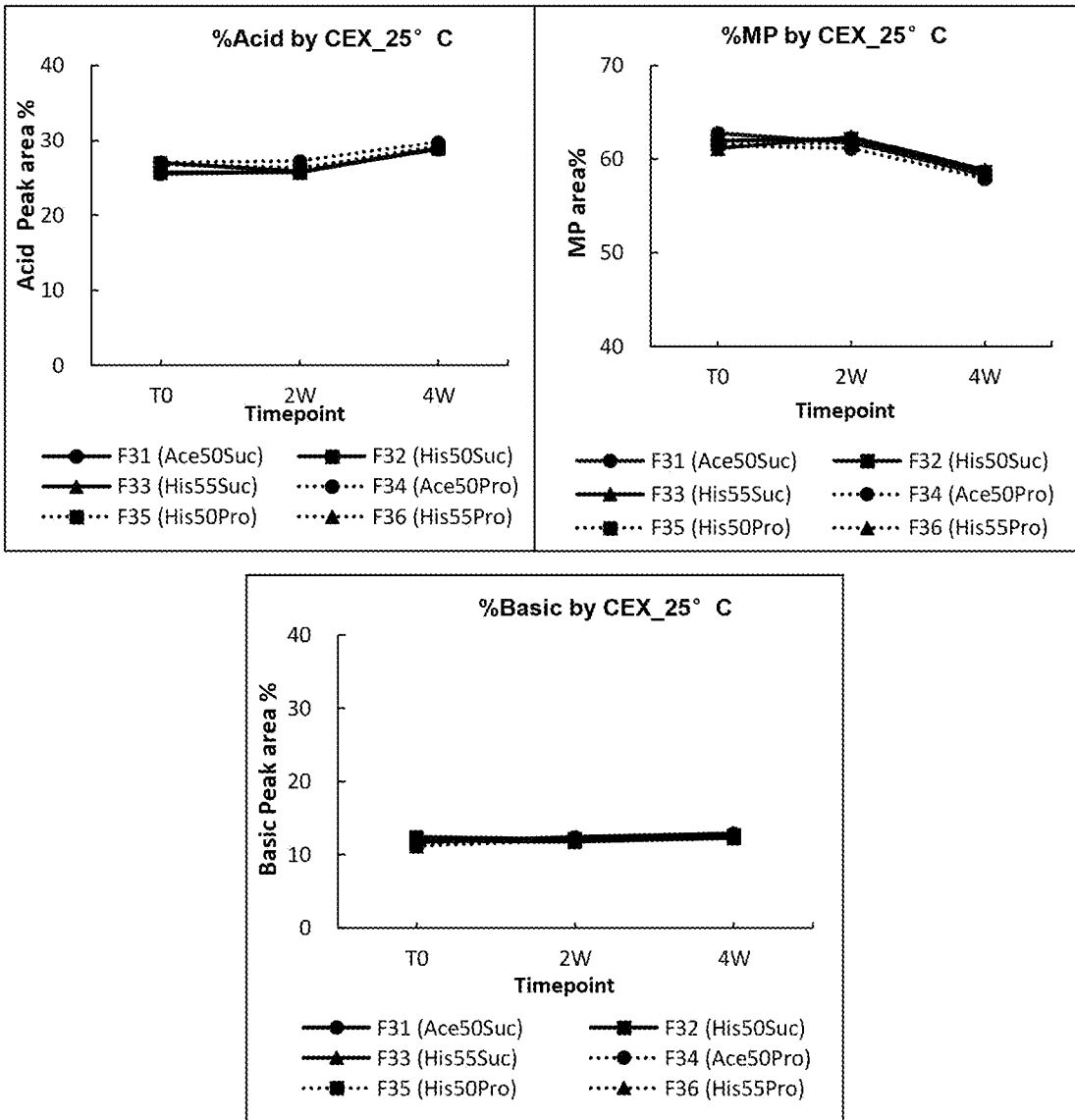


图 38

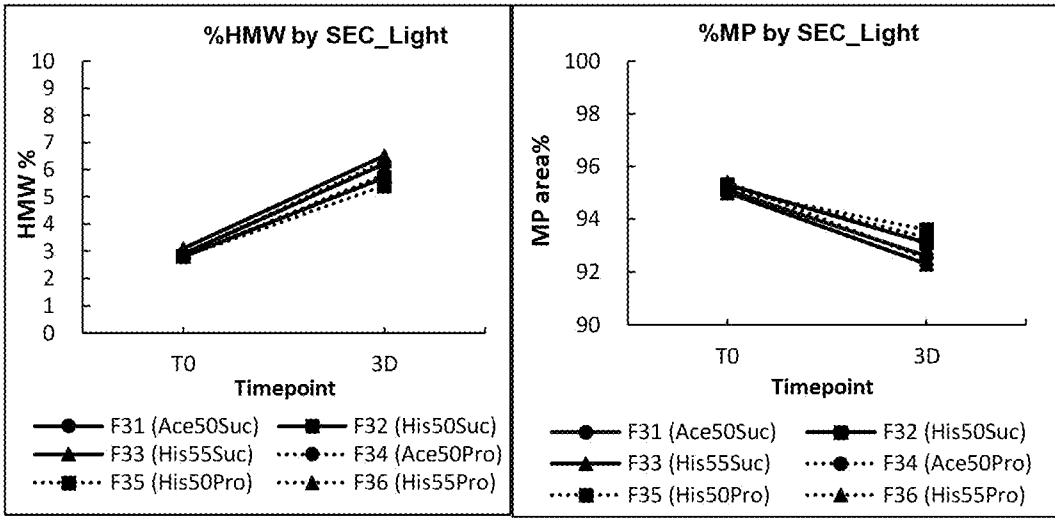


图 39

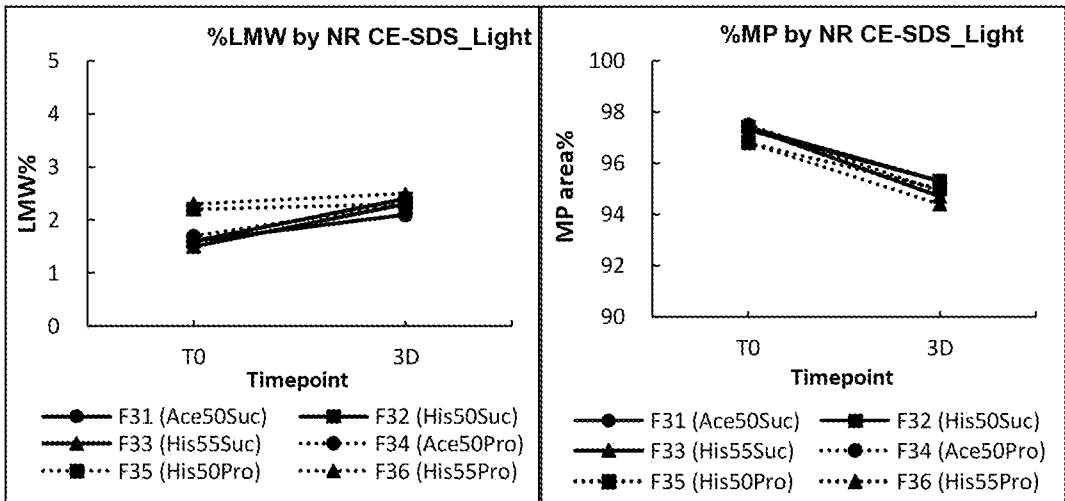


图 40

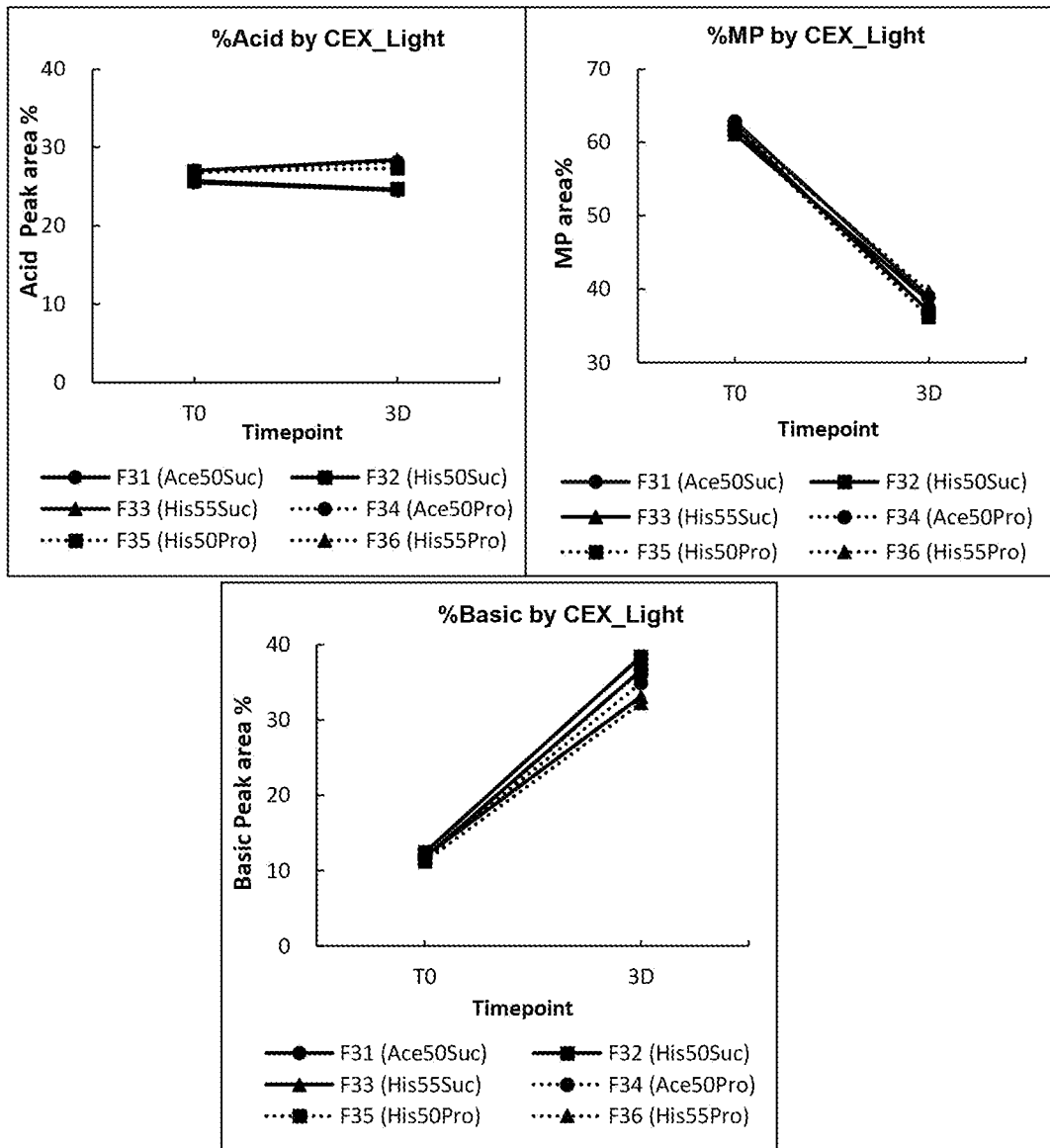


图 41

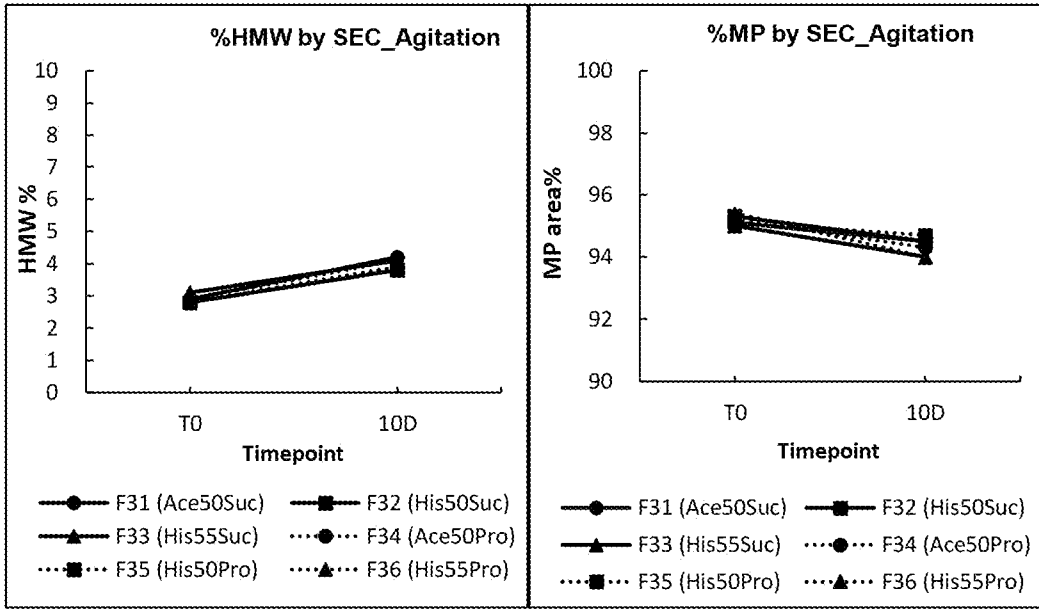


图 42

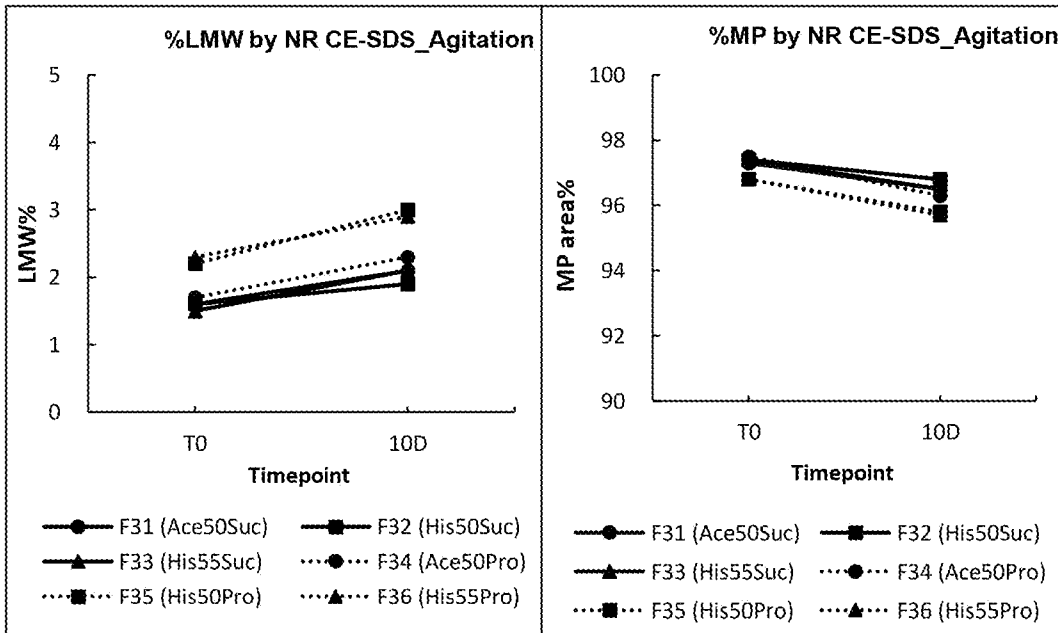


图 43

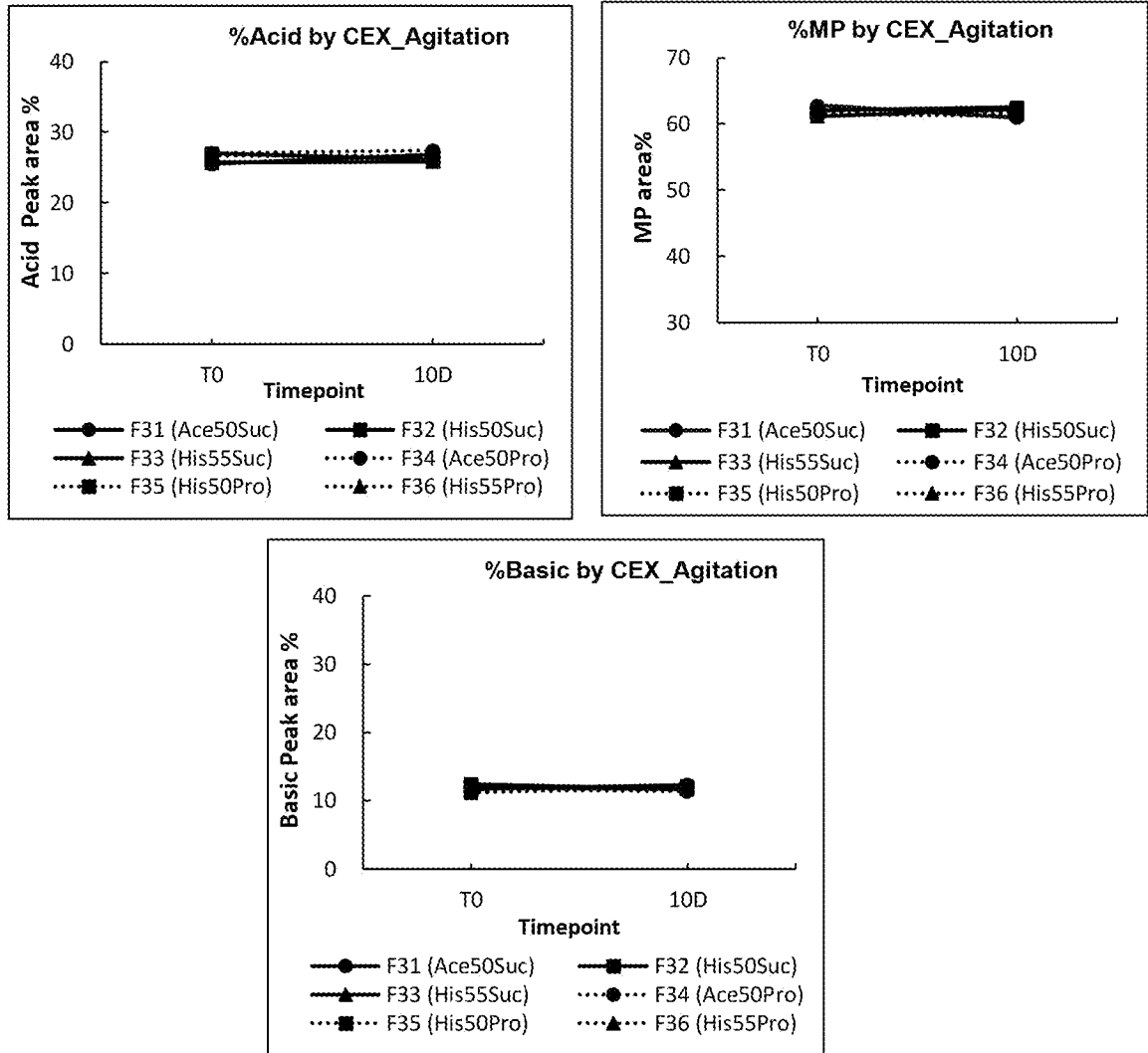


图 44