



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111148510 A

(43)申请公布日 2020.05.12

(21)申请号 201880058941.7

(22)申请日 2018.09.10

(30)优先权数据

62/559420 2017.09.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/050305 2018.09.10

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2019/055357 EN 2019.03.21

(71)申请人 美国安进公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 C.塔利

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 黄希贵

(51)Int.Cl.

A61K 9/19(2006.01)

A61K 47/10(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

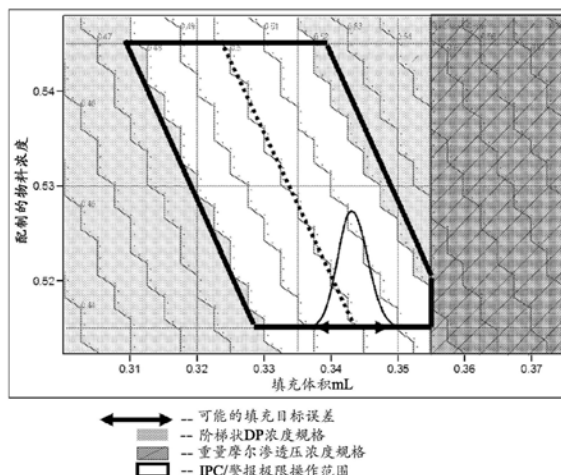
权利要求书2页 说明书27页 附图6页

(54)发明名称

用于治疗性蛋白质的冻干药物配制品的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于制备治疗性蛋白质的冻干药物配制品的方法,该方法包括(a)提供大量的该治疗性蛋白质的配制品,(b)测量在所述物料配制品中该治疗性蛋白质的浓度,(c)调整在所述物料配制品中该蛋白质的填充重量以获得固定剂量的该蛋白质,以及(d)将该蛋白质填充重量经调整的配制品冻干以在容器中获得最终配制品,其中用固定体积重构后的产品浓度在预定的接受范围内。该方法特别适合于低蛋白质浓度(例如,0.05mg/mL至20mg/mL)的配制品。



1. 一种用于制备治疗性蛋白质的冻干药物配制品的方法,该方法包括:

- a. 提供大量的该治疗性蛋白质的配制品,
- b. 测量在所述物料配制品中该治疗性蛋白质的浓度,
- c. 调整在所述物料配制品中该蛋白质的填充重量以获得固定剂量的该蛋白质,以及
- d. 将该蛋白质填充重量经调整的配制品冻干以在容器中获得最终配制品,其中用固定体积重构后的产品浓度在预定的接受范围内。

2. 如权利要求1所述的方法,其中根据以下公式计算该蛋白质的经调整填充重量

(治疗性蛋白质的目标固定剂量) x (密度)

经调整的填充重量 = -----

物料配制品中的治疗性蛋白质浓度。

3. 如权利要求1所述的方法,其中在该最终配制品中的蛋白质浓度小于或等于约20mg/mL。

4. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗性蛋白质选自罗米司亭、博纳吐单抗、英利昔单抗、曲妥珠单抗、AMG 701和AMG 330。

5. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗性蛋白质是罗米司亭,并且在该最终配制品中的治疗性蛋白质浓度是约0.5mg/mL。

6. 如权利要求1所述的方法,其中该最终配制品在约pH 5.0下包含在约10mM组氨酸、约4%w/v甘露糖醇、约2%w/v蔗糖和约0.004%聚山梨醇酯20中的约0.5mg/mL罗米司亭。

7. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗性蛋白质是博纳吐单抗,并且在该最终配制品中的治疗性蛋白质浓度是约55μg/mL。

8. 如权利要求1所述的方法,其中该配制品在约pH 7.0下包含在约25mM柠檬酸一水合物、约15% (w/v) 海藻糖、约200mM L-赖氨酸盐酸盐和约0.1% (w/v) 聚山梨醇酯80中的约55 μg/mL博纳吐单抗。

9. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗性蛋白质是英利昔单抗,并且在该最终配制品中的治疗性蛋白质浓度是约20±1.5mg/mL。

10. 如权利要求1所述的方法,其中该最终配制品在约pH 7.2下包含约20±1.5mg/mL英利昔单抗、约10mM磷酸钠、约10% (w/v) 蔗糖和约0.01% (w/v) 聚山梨醇酯80。

11. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗性蛋白质是曲妥珠单抗,并且在该最终配制品中的治疗性蛋白质浓度是约21mg/mL。

12. 如权利要求1所述的方法,其中该最终配制品在约pH 6.1下包含约21mg/mL曲妥珠单抗、约0.303mg/mL L-组氨酸、约0.470mg/mL L-组氨酸盐酸盐一水合物、约19.1mg/mL α-海藻糖二水合物和约0.0840mg/mL聚山梨醇酯20。

13. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗性蛋白质是AMG 701,并且在该最终配制品中的治疗性蛋白质浓度是约1mg/mL。

14. 如权利要求1所述的方法,其中该最终配制品在约pH 4.2下包含约1mg/mL AMG 701、约10mM L-谷氨酸、约9.0% (w/v) 蔗糖和约0.010% (w/v) 聚山梨醇酯80。

15. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗性蛋白质是AMG 330,并且在该最终配制品中的治疗性蛋白质浓度是约0.5mg/mL。

16. 如权利要求1所述的方法,其中该最终配制品在约pH 6.1下包含约0.5mg/mL AMG 330、约10mM磷酸钾、约8.0% (w/v) 蔗糖、约1.0% (w/v) 磺基丁基醚 β 环糊精(SBE-CD)和约0.010% (w/v) 聚山梨醇酯80。

17. 如权利要求1所述的方法,其中在该最终配制品中的蛋白质浓度小于或等于约25mg/mL。

18. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗性蛋白质是双特异性单链抗体构建体。

19. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗性蛋白质选自AMG 701和AMG 330。

用于治疗性蛋白质的冻干药物配制品的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物药物,具体地涉及治疗性蛋白质、其使用方法、其药物配制品以及制备药物配制品的方法。具体地,本发明涉及用于制备冻干药物配制品的方法。

背景技术

[0002] 在过去的十年中,技术的进步使得生产多种用于药物应用的活性分子变为可能。随着对生物作用机制的理解的实质的发展,可以针对某些属性对这些分子进行设计,其中少量产品可能是有效的。

[0003] 由于这些分子可能比传统的有机和无机药物更大和/或更复杂(即,除了复杂的三维结构外,还具有多个官能团),因此此类产品的配制品存在特殊的问题。为了使产品保持生物活性,配制品必须保持蛋白质氨基酸至少一个核心序列完整的构象完整性,同时保护蛋白质的多个官能团免于降解。蛋白质的降解途径可能涉及化学不稳定性(即,涉及通过产生新化学实体的键形成或断裂对蛋白质进行修饰的任何方法)或物理不稳定性(即,蛋白质高级结构的改变)。化学不稳定性可能是由脱酰胺、外消旋、水解、氧化、 β 消除或二硫键交换引起的。物理不稳定性可能是由例如变性、聚集、沉淀或吸附引起的。三种最常见的蛋白质降解途径是蛋白质聚集、脱酰胺和氧化。Cleland等人(1993),Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems[治疗性药物载体系统的关键评论]10(4):307-377。

[0004] 这些经设计的分子由于其合成性质而普遍被冻干(冷冻干燥),因为该呈现形式可以提供改善的贮存稳定性。冷冻干燥是用于保存蛋白质的常用技术,该技术用于从感兴趣的蛋白质制剂中除去水。冷冻干燥或冻干是这样一种过程,通过该过程首先冷冻要干燥的材料,并且然后通过真空环境中升华来除去冰或冷冻的溶剂。冻干前配制品中可以包括赋形剂,以增强在冷冻干燥过程期间的稳定性和/或以改善冻干产品在储存时的稳定性。Pikal,M.(1990),Biopharm.[生物制药]3(9)26-30和Arakawa等人(1991),Pharm.Res.[药物研究]8(3):285-291。

[0005] 具有特定生物学靶标的经设计的分子以及由此产生的产品剂量要求给制造过程带来了新问题。当前技术涉及一种简单的方法,其中将产品配制成目标浓度,并且然后以设定体积填充到容器中。

发明内容

[0006] 本发明涉及一种产生冻干药物产品的方法。具体地,本发明涉及在用固定体积的所用冻干产品的稀释液重构后呈现的产品的配制、填充和所需量保证。

[0007] 根据本发明,提供了一种用于制备治疗性蛋白质的冻干药物配制品的方法,该方法包括:

[0008] (a) 提供大量的该治疗性蛋白质的配制品,

[0009] (b) 测量在所述物料配制品(bulk formulation)中该治疗性蛋白质的浓度,

[0010] (c) 调整在所述物料配制品中该蛋白质的填充重量以获得固定剂量的该蛋白质,

以及

[0011] (d) 将该蛋白质填充重量经调整的配制品冻干以在容器中获得最终配制品，

[0012] 其中用固定体积重构后的产品浓度在预定的接受范围内

[0013] 在前述方法中，该最终配制品中的蛋白质浓度优选的是小于或等于约20或25mg/mL，其中约0.5mg/mL、约0.05mg/mL、约18mg/mL、约20mg/mL和约21mg/mL是最优选的。在本发明的方法中优选的治疗性蛋白质是罗米司亭、博纳吐单抗、英利昔单抗、曲妥珠单抗、AMG 701和AMG 330。AMG 701和AMG 330是双特异性单链抗体构建体，并且其他双特异性单链抗体构建体（例如，双特异性T细胞衔接器）是在本发明的方法中优选的治疗性蛋白质。存在于该配制品中的优选的药物赋形剂包含糖，其中海藻糖、蔗糖和任一者的水合物是最优选的。优选的药物赋形剂还包含缓冲剂，其中组氨酸、柠檬酸一水合物、磷酸钠、磷酸钾和谷氨酸是优选的。优选的赋形剂还包含表面活性剂，其中聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80是最优选的。根据本发明的方法使用的优选的赋形剂和治疗性蛋白质列于表1中，其中关于每者的优选浓度列于每种蛋白质和赋形剂下面。

[0014] 表1—优选的配制品组分

蛋白质	糖	缓冲液	增量剂/增溶剂	表面活性剂	pH
罗米司亭 0.5 mg/mL	蔗糖 2% w/v	组氨酸 10 mM	甘露糖醇 4% w/v	聚山梨醇酯 20 0.004% w/v	5.0
博纳吐单抗 55 mcg/mL	海藻糖 15% w/v	柠檬酸一水 合物 25 mM; L-赖氨酸盐 酸盐 200 mM	--	聚山梨醇酯 80 0.1% w/v	7.0
[0015] 英利昔单抗 20 ± 1.5 mg/mL	蔗糖 10% w/v	磷酸钠 10 mM	--	聚山梨醇酯 80 0.01% w/v	7.2
曲妥珠单抗 21 mg/mL	α,α-脱水海藻 糖 19.1 mg/mL	组氨酸 0.303 mg/mL; L-组氨酸盐 酸盐一水合 物 0.470 mg/mL	--	聚山梨醇酯 20 0.0840 mg/mL	6.1
AMG 701 1 mg/mL	蔗糖 9% w/v	L-谷氨酸 10 mM	--	聚山梨醇酯 80 0.010% w/v	4.2
AMG 330 0.5 mg/mL	蔗糖 8% w/v	磷酸钾 10 mM	SBE-CD 1% w/v	聚山梨醇酯 80 0.010% w/v	6.1

[0016] 进一步根据本发明,该配制品可以包含如下文所述的其他赋形剂。

附图说明

[0017] 图1是示出了用于低剂量产品的示例设计空间的响应面图,其中配制品和填充重量将遵循典型的控制策略。灰色空间代表其中方法/重构可变性将具有大于50%的出现失败的蛋白质浓度结果的可能性。大方框示出了用于配制品开发的当前操作范围。较小的矩形示出了有效操作范围。

[0018] 图2是示出了用于低剂量产品的示例设计空间的响应面图,其中除了物料浓度和填充体积外,还考虑了重量摩尔渗透压浓度。浅灰色区域示出了阶梯状药物产品浓度规格,其中方法/重构可变性将具有大于50%的出现失败的蛋白质浓度结果的可能性。深灰色区域示出了重量摩尔渗透压浓度规格。矩形示出了填充重量(x轴)和配制的物料浓度(y轴)过程中控制(IPC)/警报极限操作范围(ALOR)的设计空间范围。

[0019] 图3是示出了可行但不容错的填充重量和配制控制策略的实例的响应面图。曲线和双向箭头示出了可能的填充目标误差。浅灰色区域代表阶梯状药物产品浓度规格,并且浅灰色区域示出了其中方法/重构可变性将具有大于50%的出现失败的蛋白质浓度结果的可能性。深灰色区域定义了重量摩尔渗透压浓度规格。矩形示出了IPC/ALOR。

[0020] 图4是示出了在范围控制边缘有困难的填充重量和配制控制策略的实例的响应面图,其中预期的配制的物料较低并且填充重量较低。左曲线和双向箭头示出了在低填充体积下可能的填充目标误差。右曲线和双向箭头示出了在较高填充体积下可能的填充目标误差。浅灰色区域代表阶梯状药物产品浓度规格,并且浅灰色区域示出了其中方法/重构可变性将具有大于50%的出现失败的蛋白质浓度结果的可能性。深灰色区域定义了重量摩尔渗透压浓度规格。矩形示出了IPC/ALOR。

[0021] 图5是示出了使用配制的物料结果以便然后基于小瓶目标中的总产品剂量调整填充重量设定点的组合策略的实例的响应面图,从而实现了可行的、容错的冻干药物方法。曲线和双向箭头示出了可能的填充目标误差。浅灰色区域定义了如图1至4中的阶梯状药物产品浓度规格。深灰色区域定义了重量摩尔渗透压浓度规格。长菱形示出了IPC/ALOR,在IPC/ALOR内的最高填充体积下由重量摩尔渗透压浓度规格截断。

[0022] 图6示出了如根据下文实例1确定的归一化填充重量与重构后产品蛋白质浓度的关系。

[0023] 图7示出了如根据下文实例1确定的归一化填充重量与重量摩尔渗透压浓度的关系。

具体实施方式

[0024] 术语的定义

[0025] 在下面的描述中,广泛使用了许多术语。提供以下定义以便于理解本发明。

[0026] 除非另有说明,否则“一个/一种”(“a”)、“一个/一种”(“an”)、“该”和“至少一个/一种”可互换使用并且意指一个/一种或多于一个/一种。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。

[0027] 如本文所用,“药物配制品”或“配制品”是以下的无菌组合物:(i)适合于向有需要的患者肠胃外施用(包括但不限于静脉内、肌肉内、皮下、雾化、肺内、鼻内和鞘内施用)的药学活性药物,诸如生物活性蛋白质;以及(ii)由联邦药品管理局或其他外国国家主管部门认为安全的一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂和其他添加剂。药物配制品包括可以直接地施用的液体(例如,水性)溶液和可以通过在施用之前添加稀释剂而重构成溶液的冻干粉末。然而,术语“药物配制品”特别排除了向患者局部施用的组合物、经口摄入用组合物和肠胃外饲喂用组合物。

[0028] 如本文所用,“保质期”意指当将药物配制品在规定的储存条件下(例如,2°C-8°C)储存时,在期间该药物配制品中的活性成分(例如,抗体)具有最少降解(例如,不超过约5%至10%的降解)的储存期。用于评估降解的技术根据药物配制品中的蛋白质的身份而变化。示例性技术包括尺寸排阻色谱法(SEC)-HPLC,以检测例如聚集;反相(RP)-HPLC,以检测例如蛋白质片段化;离子交换-HPLC,以检测例如蛋白质电荷的变化;以及质谱法、荧光光谱法、圆二色(CD)光谱法、傅立叶变换红外光谱法(FT-IR)和拉曼光谱法,以检测蛋白质构象

变化。所有这些技术可以单独地或组合地使用以评估药物配制品中的蛋白质降解且确定该配制品的保质期。当在2°C-8°C下储存时,本发明的药物配制品优选地展现两年内增加不超过约5%至10%的降解(例如,片段化、聚集或解折叠)。

[0029] 如本文所用,生物活性蛋白质的“稳定”配制品是展现以下的配制品:(i)与对照配方样品相比,在2°C-8°C下储存至少2年后,至少20%的聚集减少和/或生物活性损失减少;或(ii)在热应激条件下(例如25°C持续1周至12周;40°C持续1至12周;52°C持续7-8天等),聚集减少和/或生物活性损失减少。在一个实施例中,当配制品中的蛋白质保持其物理稳定性、化学稳定性和/或生物活性时,认为该配制品是稳定的。

[0030] 如果例如,诸如关于浊度或聚集体的形成,在目视检查颜色和/或透明度时,或者如通过UV光散射或通过尺寸排阻色谱法(SEC)或电泳测量的,蛋白质没有显示出聚集、沉淀和/或变性迹象,则可以说该蛋白质在配制品中“保持其物理稳定性”。

[0031] 如果例如,在给定时间的化学稳定性是这样的,使得没有由通过键形成或断裂对蛋白质进行修饰而产生新化学实体,则可以说该蛋白质在配制品中“保持其化学稳定性”。在另外的实施例中,可以通过检测和定量蛋白质的化学改变形式来评估化学稳定性。化学改变可能涉及例如尺寸修饰(例如,剪切),其可以使用尺寸排阻色谱法、SDS-PAGE和/或基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱法(MALDI/TOF MS)来评价。其他类型的化学改变包括例如电荷改变(例如,由脱酰胺引起),其可以通过离子交换色谱法来评价。氧化是另一种常见的化学修饰。

[0032] 如果例如,与对照溶液相比,如通过测定(例如,抗原结合测定)确定的,配制的蛋白质(例如,抗体)的生物活性的百分比在约50%和约200%、约60%和约170%、约70%和约150%、约80%和约125%或约90%和约110%之间,则可以说该蛋白质相对于未经修饰的蛋白质在药物配制品中“保持其生物活性”。在另外的实施例中,如果例如但不限于,在给定时间的蛋白质的生物活性是至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%,则可以说该蛋白质在药物配制品中“保留其生物活性”。

[0033] 如本文所用,术语“包含”(“comprising”和“comprises”)旨在意指配制品和方法包括列出的要素,但不排除其他未列出的要素。当用于定义配制品和方法时,术语“基本上由.....组成”(“consisting essentially of”和“consists essentially of”)包括列出的要素,排除改变配制品和/或方法的基本性质的未列出的要素,但不排除其他未列出的要素。因此,基本上由本文定义的要素组成的配制品将不排除痕量的其他要素,诸如来自任何分离和纯化方法的污染物或药学上可接受的载体(例如,磷酸盐缓冲盐水)、防腐剂等,但将排除例如另外的未指定的氨基酸。当用于定义配制品和方法时,术语“由.....组成”(“consisting of”和“consists of”)排除了不只是其他成分和用于施用本文所述的组合物的实质性方法步骤的痕量要素。由这些过渡术语中的每一个定义的实施例在本披露和本文体现的本发明的范围内。

[0034] 如本文所用的术语“分离的”是指已从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的蛋白质(例如,抗体)。其天然环境的污染组分是会干扰该蛋白质的诊断或治疗用途的物质,并且可包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。在优选的实施例中,将蛋白质纯化(1)至如通过劳里法测量的大于95%重量、最优选地大于99%重量的抗体,(2)至足以获得

通过使用转杯式测序仪发现的N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至通过SDS-PAGE在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选地银染法发现的均质性。分离的蛋白质包括重组细胞内的原位蛋白质,因为蛋白质的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常通过至少一个纯化步骤来制备分离的蛋白质。

[0035] 本发明涉及用于治疗性蛋白质(诸如抗体)的药物配制品的方法。“抗体”(Ab)和同义词“免疫球蛋白”(Ig)是具有相同结构特性的糖蛋白。虽然抗体展现出对特定抗原的结合特异性,但免疫球蛋白既包括抗体也包括缺乏抗原特异性的其他抗体样分子。后一种多肽例如由淋巴系统以低水平产生并由骨髓瘤以增加的水平产生。因此,如本文所用,术语“抗体”或“抗体肽”是指完整抗体、抗体衍生物、抗体类似物、基因改变抗体、具有可检测标签的抗体、与本说明书中披露的抗体竞争特异性结合的抗体、或其与完整抗体竞争特异性结合的抗原结合片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单结构域抗体),并且包括嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体和双特异性抗体。在某些实施例中,抗原结合片段例如通过重组DNA技术产生。在另外的实施例中,抗原结合片段通过完整抗体的酶促或化学裂解产生。抗原结合片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab)²、F(ab')²、Fv和单链抗体。

[0036] 如本文所用的术语“完整抗体”是指包含两条重链和两条轻链的抗体。因此,此术语包括但不限于完全人抗体、基因改变抗体、双特异性抗体和抗体衍生物,条件是此类抗体包含两条重链和两条轻链。

[0037] 如本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指衍生自单个克隆(包括任何真核、原核或噬菌体克隆),而不是产生它的方法的抗体。

[0038] 根据本发明配制的单克隆抗体和抗体构建体具体地包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而一条或多条链的其余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出所需生物活性即可(美国专利号4,816,567;Morrison等人(1984),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*[美国国家科学院院刊],81:6851-6855)。本文感兴趣的嵌合抗体包括“灵长类化”抗体,这些抗体包含衍生自非人灵长类动物(例如,旧大陆猴、猿等)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列。已描述了多种用于制备嵌合抗体的方法。参见例如,Morrison等人(1985),*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*[美国国家科学院院刊]81:6851;Takeda等人(1985),*Nature*[自然]314:452;Cabilly等人,美国专利号4,816,567;Boss等人,美国专利号4,816,397;Tanaguchi等人,EP 0171496;EP 0173494;和GB 2177096。

[0039] 根据本发明配制的单克隆抗体和抗体构建体具体地包括称为“人”或“完全人”的抗体。术语“人抗体”和“完全人抗体”各自是指具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,包括从人免疫球蛋白文库分离的抗体或从对一种或多种人免疫球蛋白而言为转基因的并且不表达内源性免疫球蛋白的动物分离的抗体;例如,Xenomouse[®]抗体以及如Kucherlapati等人(美国专利号5,939,598)中描述的抗体。

[0040] 术语“基因改变抗体”意指其中氨基酸序列已从天然抗体的氨基酸序列发生变化的抗体。由于重组DNA技术在抗体产生中的相关性,不必局限于天然抗体中发现的氨基酸序列;可以重新设计抗体以获得所需特性。可能的变化很多,并且范围从仅变化一个或几个氨

基酸到完全重新设计例如可变区和/或恒定区。通常,进行恒定区的改变将是为了改善或改变特性,诸如补体固定、与膜的相互作用和其他效应子功能,以及可制造性和粘度。进行可变区的改变将是为了改善抗原结合特性。

[0041] “Fab片段”由一条轻链以及一条重链的C_{H1}和可变区组成。Fab分子的重链不能与另一重链分子形成二硫键。

[0042] “Fab’片段”含有一条轻链和一条重链,该重链在C_{H1}与C_{H2}结构域之间含有更多的恒定区,使得可以在两条重链之间形成链间二硫键以形成F(ab’)₂分子。

[0043] “F(ab’)₂片段”含有两条轻链和两条重链,这些重链在C_{H1}与C_{H2}结构域之间含有一部分恒定区,使得在两条重链之间形成链间二硫键。

[0044] 术语“F_v片段”和“单链抗体”是指含有来自重链和轻链两者的抗体可变区但缺乏恒定区的多肽。像完整抗体一样,它能够选择性地结合特定抗原。由于分子量仅为约25kDa, F_v片段比由两条重蛋白链和两条轻链组成的普通抗体(150-160kD)小得多,甚至比Fab片段(约50kDa,一条轻链和半条重链)还小。

[0045] “单结构域抗体”是由单结构域F_v单元(例如,V_H或V_L)组成的抗体片段。像完整抗体一样,它能够选择性地结合特定抗原。由于分子量仅为12-15kDa,单结构域抗体比由两条重蛋白链和两条轻链组成的普通抗体(150-160kDa)小得多,甚至比Fab片段(约50kDa,一条轻链和半条重链)和单链可变片段(约25kDa,两个可变结构域,一个来自轻链,一个来自重链)还小。最先的单结构域抗体是从骆驼科动物中发现的重链抗体工程化的。尽管对单结构域抗体的大多数研究目前都是基于重链可变结构域的,但已显示衍生自轻链的轻链可变结构域和纳米抗体与靶表位特异性结合。

[0046] 如本文所用的术语“双特异性”是指“至少双特异性”的抗体构建体,即该抗体构建体至少包含第一结合结构域和第二结合结构域,其中第一结合结构域与一种抗原或靶标(例如,CD3)结合,并且第二结合结构域与另一抗原或靶标(例如,BCMA;例如,CD 33)结合。因此,根据本发明的抗体构建体包含针对至少两种不同抗原或靶标的特异性。本发明的术语“双特异性抗体构建体”还涵盖多特异性抗体构建体,诸如三特异性抗体构建体,后者包括三个结合结构域,或具有超过三种(例如四种、五种……)特异性的构建体。

[0047] 鉴于根据本发明的抗体构建体是(至少)双特异性的,它们不是天然存在的并且与天然存在的产物明显不同。因此,“双特异性”抗体构建体或免疫球蛋白是具有至少两个具有不同特异性的不同结合位点的人工杂合抗体或免疫球蛋白。双特异性抗体构建体可以通过多种方法产生,这些方法包括杂交瘤的融合或Fab’片段的连接。参见例如,Songsivilai和Lachmann,Clin.Exp.Immunol.[临床实验免疫学]79:315-321(1990)。

[0048] 本发明的抗体构建体的至少两个结合结构域和可变结构域可以包含或不包含肽接头(间隔肽)。根据本发明,术语“肽接头”包含这样的氨基酸序列:通过该氨基酸序列,本发明的抗体构建体的一个(可变和/或结合)结构域和另一(可变和/或结合)结构域的氨基酸序列彼此连接。这种肽接头的基本技术特征在于它不包含任何聚合活性。适合的肽接头包括在美国专利4,751,180和4,935,233或W0 88/09344中描述的那些。肽接头也可以用于将其他结构域或模块或区(诸如半衰期延长结构域)连接到本发明的抗体构建体。

[0049] 在使用接头的情况下,该接头优选地具有足以确保第一结构域和第二结构域中的每一者均可以彼此独立地保留其差异结合特异性的长度和序列。对于连接本发明的抗体构

建体中的至少两个结合结构域(或两个可变结构域)的肽接头,仅包含少数量的氨基酸残基(例如12个氨基酸残基或更少)的那些肽接头是优选的。因此,12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸残基的肽接头是优选的。设想的具有少于5个氨基酸的肽接头包含4、3、2或1个氨基酸,其中富含Gly的接头是优选的。在所述“肽接头”的上下文中,特别优选的“单个”氨基酸是Gly。因此,所述肽接头可以由单个氨基酸Gly组成。肽接头的另一个优选的实施例的特征在于氨基酸序列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(即Gly₄Ser(SEQ ID NO:1))或其聚合物(即(Gly₄Ser)_x,其中x是1或更大(例如2或3)的整数)。优选的接头在SEQ ID NO:1-9中描绘。所述肽接头的特性(其包括不存在二级结构的促进)在本领域是已知的并且描述于例如Dall'Acqua等人(Biochem.[生物化学](1998)37,9266-9273)、Cheadle等人(Mol.Immunol.[分子免疫学](1992)29,21-30)以及Raag和Whitlow(FASEB[美国实验生物学学会联合会](1995)9(1),73-80)。此外不促进任何二级结构的肽接头是优选的。所述结构域彼此的连接可以例如通过基因工程提供,如实例中所述。用于制备融合的且可操作地连接的双特异性单链构建体并在哺乳动物细胞或细菌中表达它们的方法在本领域是熟知的(例如,WO 99/54440或Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],纽约冷泉港,2001)。

[0050] 根据一个特别优选的实施例,并如所附实例所记载,本发明的AMG 701和AMG 330抗体构建体各自是“双特异性单链抗体构建体”、更优选地双特异性“单链Fv”(scFv)。尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由独立的基因编码,但使用重组方法可以将它们通过合成接头接合,如上文所述,该合成接头使它们能够制得为单条蛋白质链,其中VL和VH区配对以形成单价分子;参见例如,Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA[美国国家科学院院刊]85:5879-5883。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且按照与完整或全长抗体相同的方式评价片段的功能。因此,单链可变片段(scFv)是免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)可变区的融合蛋白,通常利用约10至约25个氨基酸、优选地约15至20个氨基酸的短接头肽连接。接头通常富含甘氨酸以获得柔韧性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性,并且可以连接VH的N端和VL的C端,或反之亦然。尽管除去了恒定区并引入了接头,但该蛋白质保留了原始免疫球蛋白的特异性。

[0051] 双特异性单链分子在本领域是已知的,并且描述于WO 99/54440、Mack, J.Immunol.[免疫学杂志](1997),158,3965-3970、Mack,PNAS[美国国家科学院院刊],(1995),92,7021-7025、Kufer,Cancer Immunol.Immunother.[癌症免疫学与免疫疗法],(1997),45,193-197、Löffler,Blood[血液学],(2000),95,6,2098-2103、Brühl,Immunol.[免疫学],(2001),166,2420-2426、Kipriyanov,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],(1999),293,41-56。描述的用于产生单链抗体的技术(尤其参见美国专利4,946,778)可以适用于产生特异性识别一种或多种所选择的靶标的单链抗体构建体。

[0052] 二价(bivalent)(也称为双价(divalent))或双特异性单链可变片段(具有形式(scFv)₂的二-scFv或双-scFv)可以通过连接两个scFv分子(例如利用如上文所述的接头)来工程化。如果这两个scFv分子具有相同的结合特异性,则所得(scFv)₂分子将优选地称为二价的(即,对于相同的靶表位具有两个价)。如果两个scFv分子具有不同的结合特异性,则所得(scFv)₂分子将优选地称为双特异性的。连接可以通过产生具有两个VH区和两个VL区的单条肽链从而产生串联scFv来进行(参见例如,Kufer P.等人,(2004)Trends in

Biotechnology[生物技术趋势]22(5):238-244)。另一种可能性是产生具有接头肽的scFv分子,这些接头肽对于两个可变区来说太短以致于不能折叠在一起(例如约5个氨基酸),从而迫使scFv二聚化。这种类型被称为双抗体(参见例如,Hollinger,Philipp等人,(1993年7月)Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America[美国国家科学院院刊]90(14):6444-8)。

[0053] 如上文所述,本发明提供了一个优选的实施例,其中抗体构建体处于选择下组的形式,该组由以下组成:(scFv)₂、scFv-单结构域mAb、双抗体和任何那些形式的寡聚物。

[0054] 根据本发明抗体构建体的另一个优选的实施例,与靶抗原CD3和CD33或BCMA结合的结合结构域的重链(VH)和轻链(VL)不经由上述肽接头直接连接,但是由于形成了如针对双抗体所述的双特异性分子,形成了结合结构域。因此,CD3结合结构域的重链(VH)可以经由这种肽接头与CD33或BCMA结合结构域的轻链(VL)融合,同时CD3结合结构域的重链(VH)经由这种肽接头与CD33或BCMA结合结构域的轻链(VL)融合。

[0055] 术语“氨基端”和“羧基端”及其缩写形式“N端”和“C端”在本文中用于表示多肽内的位置。在上下文允许的情况下,这些术语参考多肽的特定序列或部分而用于表示接近度或相对位置。例如,位于多肽内的参考序列的羧基端的某个序列位于该参考序列的氨基端附近,但不一定位于完整多肽的羧基端。

[0056] 如本文所用,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括甘氨酸以及D和L旋光异构体、氨基酸类似物和拟肽,包括但不限于D或L旋光异构体的N-乙酰基类似物(例如,N-乙酰精氨酸)。在一些方面,术语氨基酸是指单体氨基酸。

[0057] 通常,结合本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学及杂交而使用的命名法及其技术是本领域熟知且常用的那些命名法及技术。除非另有指示,否则本发明的方法及技术根据本领域熟知的常规方法且如贯穿本说明书所引用及论述的各种通用及更特定参考文献中所描述来进行。参见例如,Sambrook等人(2001),Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],纽约冷泉港和Ausubel等人(1992),Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学实验指南],Greene Publishing Associates[格林出版协会]以及Harlow和Lane(1990),Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],纽约冷泉港。任何酶促反应及纯化技术是根据制造商的说明书、如本领域中通常所实现或如本文所描述来进行。结合本文所述的分析化学、合成有机化学以及医药和药物化学而使用的术语及其实验室程序与技术是本领域熟知且常用的那些术语及实验室程序与技术。标准技术可以用于化学合成,化学分析,药物制备、配制及递送,以及治疗患者。

[0058] 中间配制浓度的使用

[0059] 蛋白质配制的目标是将高度纯化的重组蛋白质溶液(原料药)转化为稳定的有效的生物药物剂型。Kamerzell等人(2011),63(13):1118-59(通过引用并入)。第一步通常称为预配制品表征,涉及确定蛋白质的理化性质和不稳定性途径,这允许设计含有各种赋形剂的配制品,以确保蛋白质在规定的储存条件下的稳定性。同时,需要开发在配制条件下(例如,在赋形剂存在下)监测蛋白质的理化完整性和生物活性的分析方法,以及为这些参

数的任何变化定义可接受限度的规格。然后,通过实验测试具有目标水平的各种药物赋形剂的不同蛋白质浓度下的特定配制品,以确保在保质期内的稳定性、溶解性和张度。此外,选择主要容器(例如,小瓶,药筒或预装注射器)以储存蛋白质-赋形剂混合物,并且便于由患者或医疗专业人员进行肠胃外施用。必须将整个生物药物或疫苗剂型(蛋白质、赋形剂、主要容器和递送装置)设计为具有可扩展性(以允许在无菌条件下进行商业生产)以及满足用于人类使用的生物药物剂型的生产和测试的所有法规指南。

[0060] 配制品开发通常开始于通过生物物理筛选策略来鉴定正确的pH和缓冲液系统。将缓冲液添加到蛋白质溶液中以稳定pH,pH进而稳定蛋白质,因为蛋白质的稳定性通常与特有的狭窄的pH范围相关联。参见Garidel和Bassarab(2009),“Impact of formulation design on stability and quality,”in: Quality for Biologics: Critical Quality Attributes, Process and Change Control, Production Variation, Characterisation, Impurities and Concerns [“配制品设计对稳定性和质量的影响”,在: 生物制品的质量: 关键质量属性、过程和变更控制、生产变化、特征化、杂质和问题], Biopharm Knowledge Publishing [生物制药知识出版社], 英国伦敦, 第94-113页(通过引用并入)。然后将其他配制品赋形剂(诸如稳定剂(例如,糖)、增量剂(例如,甘露糖醇)和表面活性剂(例如,聚山梨醇酯20))添加到缓冲的蛋白质溶液中。对于冻干配制品,然后将这种液体形式的配制品混合物冻干。

[0061] 与其他药物产品过程一样,在冻干中,关键的控制是治疗性蛋白质的填充重量,以向患者递送所需剂量。对于较高浓度的产品,在配制阶段控制产品浓度然后控制填充重量作为填充过程的一部分的简单策略是足够的。然而,对于微克或甚至毫克产品的非常低剂量的递送,这种确保剂量递送的简单策略开始在确保患者可以接受所需剂量方面出现了问题。相关的担忧是产品标签可能无法反映容器内的产品,并且可能难以提取用于给药的材料。因此,需要一种提供对在冻干药物配制品中的治疗性蛋白质的填充重量的更大控制的方法。

[0062] 如上所述,在配制阶段控制产品浓度然后控制填充重量作为填充过程的一部分的简单策略对于较高浓度的治疗性蛋白质而言是足够的,但在较低浓度下可能导致问题。当分别控制填充重量和配制目标时,用于低剂量产品的填充重量控制的设计空间示出了较高的可变性,并且产品将不满足释放规格的可能性更大。由于制造的可变性,由于制造中过程的规模和设备固有的可变性,无法精确控制配制的物料。另一个问题是,因为必须重构产品(这也是可变的),冻干产品增加的可变性是固有的。

[0063] 典型控制策略(示于图1)将具有大于50%的出现失败的蛋白质浓度结果的可能性。在图1中,观察到的冻干均质性数据的总体可变性是0.01mg/mL。为了确保最小的能力,必须限制平均工作范围,使得其与以 $3 \times 0.01 = 0.03 \text{mg/mL}$ “为阶梯”的规格范围相对应。针对空白空间内的过程每批次具有小于0.1%的检验结果偏差(OOS)小瓶的质量。相反,针对阴影区域内的过程具有更高的OOS率。如从图1可以看出,当前的操作范围(大方框)含有所需配制品失败的边缘。然而,有效操作范围(图1中较小的矩形)要求比作为配制品可变性和填充重量控制两者的一部分能够获得的更严格的填充容差。

[0064] 因此,还需要考虑其他产品质量属性(例如,重量摩尔渗透压浓度、pH)以及蛋白质浓度的方法根据标准方法学可能是无法生产的或是不可行的。图2示出了考虑重量摩尔渗

透压浓度规格的示例设计空间。灰色着色示出了IPC/警报极限操作范围内的广泛故障条件。

[0065] 标准方法学还可以得到可行的但是不容错的填充重量和配制控制策略(参见图3)。如图1所示,IPC/ALOR含有不满足药物产品浓度规格的区域。在满足药物产品浓度规格的区域(IPC/ALOR内的白色区域)内,填充目标的误差空间很小。因此,如图3所示,标准方法学可能得到在范围控制的边缘有困难、可行但是没有足够的容错能力的过程。

[0066] 填充体积的增加对于产生具有足够的容错能力的可行的配制的过程变化可能不足。图4是填充体积增加的响应面图。填充目标范围可能在IPC/ALOR和产品规格内,但是容错能力可能仍然不足。在配制的物料浓度可允许范围内的填充重量范围具有不足的容错能力。

[0067] 如果然后将配制的物料结果用于调整治疗性蛋白质的填充重量,则可以改变操作范围,以足以使配制既可行又具有足够的容错能力。如图5所示,经修改的操作范围(IPC/ALOR)允许预期的填充目标范围完全在浓度和重量摩尔渗透压浓度规格之内。这样,可以在具有足够的容错能力的浓度和其他规格内提供填充目标范围。

[0068] 迄今为止,此技术已用于罗米司亭(Nplate®)低剂量SKU、博纳吐单抗(Blincyto®)、英利昔单抗和曲妥珠单抗的低剂量库存量单位(SKU)。此技术的使用细节在下文的工作实例中示出。

[0069] 一般赋形剂

[0070] 配制品中的一个挑战是使抵抗制造、运输和储存的压力来稳定产品,这可以通过某些配制品赋形剂来实现。通常,可以基于赋形剂抵抗各种化学和物理压力来稳定蛋白质的机制对赋形剂进行分类。一些赋形剂减轻特定压力的影响或调节特定蛋白质的具体敏感性。其他赋形剂通常更会影响蛋白质的物理和共价稳定性。

[0071] 表2示出了液体和冻干蛋白质配制品的常见赋形剂(参见Kamerzell等人(2011), *Advanced Drug Delivery Rev.* [先进药物输送评论] 63 (13):1118-59)。

[0072] 表2:蛋白质配制品的赋形剂组分

[0073]

赋形剂组分	功能	实例
缓冲液	<ul style="list-style-type: none"> o 维持溶液的 pH o 缓冲离子与蛋白质特异性相互作用 	<ul style="list-style-type: none"> o 柠檬酸盐 o 琥珀酸盐 o 乙酸盐 o 谷氨酸 o 天冬氨酸 o 组氨酸 o 磷酸盐 o Tris o 甘氨酸
糖和碳水化合物	<ul style="list-style-type: none"> o 稳定蛋白质 o 张度调节剂 o 吸入药物的载体 (乳糖) 	<ul style="list-style-type: none"> o 蔗糖 o 海藻糖 o 山梨糖醇

[0074]

	<ul style="list-style-type: none"> o 静脉内施用期间的右旋糖溶液 	<ul style="list-style-type: none"> o 甘露糖醇 o 葡萄糖 o 乳糖 o 环糊精衍生物
稳定剂和 增量剂	<ul style="list-style-type: none"> o 提高产品的美观度并且防止爆裂 o 为冻干饼提供结构强度 	<ul style="list-style-type: none"> o 甘露糖醇 o 甘氨酸
渗透剂	<ul style="list-style-type: none"> o 抵抗环境压力 (温度、脱水) 来稳定 	<ul style="list-style-type: none"> o 蔗糖 o 海藻糖 o 山梨糖醇 o 甘氨酸 o 脯氨酸 o 谷氨酸 o 甘油 o 尿素
氨基酸	<ul style="list-style-type: none"> o 与蛋白质特异性相互作用 o 抗氧化剂 (His、Met) o 缓冲、张度调节 	<ul style="list-style-type: none"> o 组氨酸 o 精氨酸 o 甘氨酸 o 脯氨酸 o 赖氨酸 o 甲硫氨酸 o 氨基酸混合物 (例如, glu/arg)
蛋白质和 聚合物	<ul style="list-style-type: none"> o 竞争性蛋白质抑制剂 吸附 o 冻干用增量剂 o 药物递送媒介物 	<ul style="list-style-type: none"> o HSA o PVA o PVP o PLGA o PEG o 明胶 o 葡聚糖 o 羟乙基淀粉 o HEC

[0075]

		<ul style="list-style-type: none"> o CMC
抗氧化剂	<ul style="list-style-type: none"> o 防止氧化性蛋白质损伤 o 金属离子结合剂（如果将金属包括为共因子或需要蛋白酶活性的话） o 自由基清除剂 	<ul style="list-style-type: none"> o 还原剂 o 除氧剂 o 自由基清除剂 o 螯合剂（例如，EDTA、EGTA、DTPA） o 乙醇
金属离子	<ul style="list-style-type: none"> o 蛋白质共因子 o 配合物（悬浮液） 	<ul style="list-style-type: none"> o 镁 o 锌
特定配体	<ul style="list-style-type: none"> o 抵抗压力诱导的解折叠的天然构象稳定剂 o 提供构象灵活性 	<ul style="list-style-type: none"> o 金属 o 配体 o 氨基酸 o 聚阴离子
表面活性剂	<ul style="list-style-type: none"> o 竞争性蛋白质吸附抑制剂 o 竞争性蛋白质表面变性抑制剂 o 脂质体作为药物递送媒介物 o 冻干期间的聚集抑制剂 o 冻干产品的重构时间的减速剂 	<ul style="list-style-type: none"> o 聚山梨醇酯 20 o 聚山梨醇酯 80 o 泊洛沙姆 188 o 阴离子表面活性剂（例如，磺酸盐和磺基琥珀酸盐） o 阳离子表面活性剂 o 两性离子表面活性剂
盐	<ul style="list-style-type: none"> o 张度调节剂 o 蛋白质、尤其是阴离子的稳定剂或去稳定剂 	<ul style="list-style-type: none"> o NaCl o KCl o NaSO₄
防腐剂	<ul style="list-style-type: none"> o 防止配制品中的微生物生长 	<ul style="list-style-type: none"> o 苯甲醇 o 间甲酚 o 苯酚

[0076] 其他赋形剂在本领域是已知的，并且可以发现于Powell等人(1998)，“Compendium of Excipients for Parenteral Formulations [肠胃外配制品赋形剂汇编]”，PDA J.Pharm.Sci.Tech. [PDA药物科学技术杂志]，52:238-311，将其通过引用特此并入。

[0077] 鉴于本文提供的教导和指导,本领域技术人员将知道可以在任何特定配制品中包括多少量或范围的赋形剂以获得本发明的生物药物配制品。例如,可以基于最终溶液的所需重量摩尔渗透压浓度(即,等渗、低渗或高渗)以及在配制品中要包括的其他组分的量和重量摩尔渗透压浓度来选择在本发明的生物药物配制品中要包括的盐的量和类型。类似地,通过参考包括在配制品中的多元醇或糖的类型为例,这种赋形剂的量将取决于其重量摩尔渗透压浓度。

[0078] 本领域技术人员可以确定在任何特定配制品中可以包括多少量或范围的赋形剂,以获得促进保留生物药物的稳定性的本发明的生物药物配制品。例如,可以基于最终溶液的所需重量摩尔渗透压浓度(即,等渗、低渗或高渗)以及在配制品中要包括的其他组分的量和重量摩尔渗透压浓度来选择在本发明的生物药物配制品中要包括的盐的量和类型。类似地,通过参考包括在配制品中的多元醇或糖的类型为例,这种赋形剂的量将取决于其重量摩尔渗透压浓度。

[0079] 例如,约5%(重量/体积)的山梨糖醇可以实现等渗性,而需要约9%(重量/体积)的蔗糖赋形剂来实现等渗性。上文通过参考盐、多元醇和糖已例示了可以在本发明的生物药物配制品中包括的一种或多种赋形剂的量或浓度范围的选择。然而,本领域技术人员将理解,本文所述的以及通过参考特定赋形剂进一步例示的考虑因素同样适用于赋形剂的所有类型和组合,包括例如盐、氨基酸、其他张度剂、表面活性剂、稳定剂、增量剂、冷冻保护剂、冻干保护剂、抗氧化剂、金属离子、螯合剂和/或防腐剂。

[0080] 此外,在以例如百分比(%)w/v报告在配制品中的特定赋形剂的情况下,本领域技术人员将认识到也考虑了该赋形剂的当量摩尔浓度。

[0081] 本领域普通技术人员将认识到,上述赋形剂的浓度在特定配制品内具有相互依赖性。举例来说,例如在高蛋白质/肽浓度或高稳定剂浓度的情况下,可以降低增量剂的浓度。此外,本领域普通技术人员将认识到,为了维持没有增量剂的特定配制品的等渗性,将相应地调整稳定剂的浓度(即,将使用“张度调节”的量的稳定剂)。

[0082] 缓冲液

[0083] 溶液的pH影响蛋白质的氨基酸残基的化学完整性(例如,Asn脱酰胺和Met氧化)及其高级结构的维持。因此,本领域技术人员使用缓冲剂来控制溶液的pH并且优化蛋白质稳定性。蛋白质药物的最大稳定性通常在狭窄的pH范围内。几种方法(例如,加速稳定性研究和量热筛选研究)可用于此目的(Remmele等人(1999),*Biochemistry*[生物化学],38(16):5241-7)。最终敲定配方后,必须制造药物产品并且使其在整个保质期内维持在预定的规格内。因此,几乎总是采用缓冲剂来控制配制品中的pH。

[0084] 有机酸、磷酸盐和Tris通常被用作蛋白质配制品中的缓冲液(参见表3)。缓冲种类的缓冲容量在等于pKa的pH下最大,并且随着pH远离此值增加或减小而降低。百分之九十的缓冲能力存在于其pKa的一个pH单位内。缓冲容量也随缓冲液浓度的增加而成比例增加。

[0085] 表3:常用的缓冲剂及其pKa值

缓冲液	pK _a	示例药物产品
乙酸盐	4.8	Neupogen®、Neulasta®
琥珀酸盐	pK _{a1} = 4.8, pK _{a2} = 5.5	Actimmune®
柠檬酸盐	pK _{a1} = 3.1, pK _{a2} = 4.8, pK _{a3} = 6.4	Humira®
组氨酸 (咪唑)	6.0	Xolair®
磷酸盐	pK _{a1} = 2.15, pK _{a2} = 7.2, pK _{a3} = 12.3	Enbrel® (液体配制品)
Tris	8.1	Leukine®

[0086] 除了上述内容外，一些治疗性蛋白质可能会在药学上相关的浓度下自我缓冲。此类蛋白质的配制品可能根本不需要包括常规缓冲液。参见美国专利申请2012/0028877，将其通过引用特此并入。

[0088] 糖和碳水化合物

[0089] 糖常用于稳定在液体和冻干配制品中的蛋白质。据信诸如蔗糖和海藻糖的二糖通过在液体状态下以高浓度优先水合以及通过与蛋白质特异性相互作用和在固体状态下形成粘性玻璃状基质来稳定蛋白质。糖分子可以增加单克隆抗体溶液的粘度，这可能是由于优先水合的机制。糖醇（诸如山梨糖醇）可以稳定溶液中和冻干状态的蛋白质。甘露糖醇通常在冻干配制品中用作增量剂。乳糖被用作蛋白质吸入配制品的载体分子。环糊精衍生物可以稳定抗体、疫苗抗原和此类较小的蛋白质（诸如生长因子、白细胞介素-2和胰岛素）的液体配制品中的蛋白质。稳定剂和增量剂

[0090] 增量剂典型地用于冻干配制品中，以提高产品的美观度并且防止爆裂。通常这样设计配制品中的条件，使得增量剂从冷冻的无定形相中结晶出来（在冷冻期间或在高于T_g'下退火期间），从而得到饼状结构和膨松性。甘露糖醇和甘氨酸是常用的增量剂的实例。

[0091] 稳定剂包括一类可以用作冷冻保护剂、冻干保护剂和玻璃形成剂的化合物。冷冻保护剂在冷冻期间或在低温下的冷冻状态下稳定蛋白质（P. Cameron编辑，Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice[药物冷冻干燥良好实践]，Interpharm Press, Inc. [国际药品出版公司]，伊利诺伊州布法罗格罗夫，(1997)）。通过在冷冻干燥的脱水阶段期间保留蛋白质的天然样构象性质，冻干保护剂稳定冷冻干燥的固体剂型中的蛋白质。玻璃态性质根据其作为温度的函数的松弛性质被分类为“强”或“易碎”。重要的是，冷冻保护剂、冻干保护剂和玻璃形成剂与蛋白质保持相同的相以赋予稳定性。糖、聚合物和多元醇落入此类别，并且有时可以发挥所有三种作用。

[0092] 多元醇涵盖一类赋形剂，其包括糖（例如，甘露糖醇、蔗糖、山梨糖醇）和其他多元醇（例如，甘油和丙二醇）。聚合物聚乙二醇(PEG)包括在此类别中。多元醇通常用作液体和冻干的肠胃外蛋白质配制品中的稳定赋形剂和/或等渗剂。关于霍夫迈斯特序，多元醇是亲液的，并且优先地从蛋白质表面排除。多元醇可以保护蛋白质免受物理和化学降解途径的

影响。优先排除的共溶剂增加了溶剂在蛋白质界面处的有效表面张力,由此在能量上最有利的蛋白质构象是具有最小的表面积的那些。

[0093] 甘露糖醇在冻干配制品中是受欢迎的增量剂,因为它在冷冻干燥期间会从无定形蛋白质相中结晶出来,从而给出饼(例如, **Leukine®**、**Enbrel® - Lyo**、**Betaseron®**)的结构稳定性。它通常与冷冻保护剂和/或冻干保护剂(像蔗糖)组合使用。由于甘露糖醇倾向于在冷冻条件下结晶,因此山梨糖醇和蔗糖是液体配制品中优选的张度剂/稳定剂,以保护产品在运输期间或在制造前冷冻物料时抵抗冻融压力。山梨糖醇和蔗糖更能抵抗结晶,并且因此与蛋白质相分离的可能性较小。有趣的是注意到,虽然甘露糖醇已在几种市售的液体配制品(诸如 **Actimmune®**、**Forteo®**和**Rebif®**)中以张度调节量使用,但是这些药物的产品标签上都带有“请勿冷冻”警告。应避免使用还原糖(含有游离醛或酮基团),诸如葡萄糖和乳糖,因为它们可以经由醛和伯胺的美拉德反应而发生反应并且使蛋白质表面赖氨酸和精氨酸残基糖化(Chevalier F等人, *Nahrung*[食物], 46(2):58-63(2002); Humeny A等人, *J AgricFood Chem.*[农业与食品化学杂志] 50(7):2153-60(2002))。蔗糖在酸性条件下可以水解为果糖和葡萄糖(Kautz C.F.和Robinson A.L., *JACS*[美国化学会志], 50(4) 1022-30(1928)),并且因此可能引起糖化。

[0094] 在本发明组合物的特定实施例中,将稳定剂(或稳定剂的组合)添加到冻干配制品中以防止或减少冻干诱导的或储存诱导的聚集和化学降解。重构后模糊或混浊的溶液表明蛋白质已沉淀。术语“稳定剂”意指能够防止聚集或其他物理降解以及水和固态的化学降解(例如,自溶、脱酰胺、氧化等)的赋形剂。常规应用于药物组合物中的稳定剂包括但不限于蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露糖醇、山梨糖醇、甘氨酸、精氨酸HCL、多羟基化合物(包括多糖诸如葡聚糖、淀粉、羟乙基淀粉、环糊精、N-甲基吡咯烷(N-methyl pyrrolidene)、纤维素和透明质酸)、氯化钠, Carpenter等人(1991), *Develop. Biol. Standard*[发育生物学标准] 74:225。

[0095] 渗透剂

[0096] 表2列出了目前用作蛋白质配制品赋形剂的渗透剂。在自然界中通常发现的可用作赋形剂的其他渗透剂包括牛磺酸、甜菜碱、三甲胺N-氧化物(TMAO)、胆碱-O-硫酸盐和肌氨酸。

[0097] 蛋白质和聚合物

[0098] 基于蛋白质的赋形剂增加了配制品的复杂性,尤其是在开发分析方法以监测在基于蛋白质的赋形剂存在下基于蛋白质的药物或疫苗的稳定性的方面。已在冻干蛋白质配制品中对聚合物作为赋形剂(例如,作为增量剂)进行了评价。正在研究蛋白质药物和疫苗的控释配制品,其中用聚合物(诸如聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)和聚乙二醇(PEG))配制蛋白质。已将许多另外的水溶性聚合物(例如,羟乙基纤维素(HEC)、羧甲基纤维素(CMC))用于蛋白质药物的局部配制品。

[0099] PEG可以通过两种不同的温度依赖性机制来稳定蛋白质。在较低的温度下,优先地将其从蛋白质表面排除,但是由于其两亲性,已显示在较高的温度下与蛋白质的未折叠形式相互作用(Lee和Lee(1987), *Biochemistry*[生物化学], 26(24):7813-9)。它可以经由在较低温度下优先排除来保护蛋白质,但是也可能通过在较高温度下减少未折叠分子之间的

有效碰撞次数来保护蛋白质。PEG也是一种冷冻保护剂,并且已用于 **Recombinate®** (重组抗血友病因子的冻干配制品) 中。

[0100] 抗氧化剂

[0101] 许多不同的来源可以氧化蛋白质残基。可以通过仔细控制产品的制造过程和储存(包括诸如大气氧、温度、曝光和化学污染的此类因素) 最小化氧化性蛋白质损伤。在此类控制不足的情况下,在配制品中可以包括抗氧化剂赋形剂。

[0102] 最常用的药物抗氧化剂赋形剂是还原剂、氧/自由基清除剂或螯合剂。治疗性蛋白质配制品中的抗氧化剂必须是水溶性的并且在整个产品保质期内保持活性。还原剂和氧/自由基清除剂通过消融溶液中的活性氧种类起作用。通过结合促进自由基形成的痕量金属污染物的螯合剂(例如,EDTA) 可以是有效的。例如,在酸性成纤维细胞生长因子的液体配制品中,EDTA抑制金属离子催化的半胱氨酸残基的氧化。EDTA已用于市售的产品,像 **Kineret®**和 **Ontak®**。

[0103] 金属离子

[0104] 通常,过渡金属离子在蛋白质配制品中是不希望的,因为它们可以催化蛋白质中的物理和化学降解反应。然而,当特定金属离子充当蛋白质的共因子时,则将它们包括在配制品中。金属离子也可以用于蛋白质的悬浮液配制品中,在其中它们形成配合物(例如,胰岛素的锌悬浮液)。已提出使用镁离子(10-120mM) 来抑制天冬氨酸异构化成异天冬氨酸(WO 2004/039337)。

[0105] 发现金属离子在人脱氧核糖核酸酶(rhDNA酶, **Pulmozyme®**) 的配制品中赋予稳定性和/或增加的活性。 Ca^{+2} 离子(高达100mM) 通过特异性结合位点增加酶的稳定性(Chen等人(1999), *J. Pharm. Sci.* [药物科学杂志] 88(4):477-82)。事实上,用EGTA从溶液中除去钙离子引起脱酰胺和聚集的增加。然而,只有在 Ca^{+2} 离子的情况下才观察到此效果;观察到其他二价阳离子 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 使rhDNA酶去稳定。

[0106] 在因子VIII的配制品中观察到相似的效果。 Ca^{+2} 和 Sr^{+2} 离子稳定蛋白质,而其他离子(像 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 、 Cu^{+2} 和 Fe^{+2}) 使其去稳定(Fatouros等人(1997), *Int. J. Pharm.* [国际药物杂志], 155, 121-131)。在使用因子VIII的单独的研究中,观察到在 Al^{+3} 离子存在下聚集速率的显著增加(Derrick等人(2004), *J. Pharm. Sci.* [药物科学杂志], 93(10):2549-57)。作者注意到其他赋形剂(像缓冲盐) 通常被 Al^{+3} 离子污染,并说明需要在配制的产品中使用适当质量的赋形剂。含有活的或杀死的减毒小核糖核酸病毒(诸如甲型肝炎和脊髓灰质炎) 的疫苗通过镁进行构象稳定。金属离子(诸如钙、镁和锌) 改善了催产素在水溶液中的稳定性。胰岛素可以结合锌,导致形成结晶形式的二聚体和六聚体,这允许制备具有不同体内释放曲线的不同配制品。在不同水平的锌和苯酚存在下,六聚体胰岛素配制品的化学和热稳定性会发生变化。

[0107] 特定配体

[0108] 改善蛋白质治疗性药物的构象稳定性的一种方法是利用蛋白质固有的配体结合位点。例如, **Pulmozyme®**不仅需要二价金属离子用于其酶活性,而且在钙离子存在下,它具有改善的构象稳定性。已在临床上评价了酸性和碱性成纤维细胞生长因子(aFGF和bFGF) 促进伤口愈合的能力,并且两种蛋白质都与细胞表面带高负电荷的蛋白聚糖天然结合。多

种其他带高负电荷的化合物也通过与蛋白质的聚阴离子结合位点相互作用来结合并且显著稳定aFGF。

[0109] 表面活性剂

[0110] 蛋白质分子高度倾向于与表面相互作用,使得它们易于在气-液、小瓶-液和液-液(硅油)界面吸附和变性。此降解途径反过来取决于蛋白质浓度,并且产生可溶或不可溶的蛋白质聚集体或通过吸附到表面而导致蛋白质从溶液中损失。除了容器表面吸附外,物理搅动也会加剧表面诱导的降解,如在运输和搬运期间将会经历的一样。

[0111] 表面活性剂通常用于蛋白质配制品中以防止表面诱导的降解。表面活性剂是两亲性分子,具有与蛋白质竞争界面位置的能力。表面活性剂分子的疏水部分占据界面位置(例如,空气/液体),而分子的亲水部分保持朝向物料溶剂定向。在足够的浓度下(典型地在洗涤剂的临界胶束浓度附近),表面活性剂分子的表面层用于防止蛋白质分子吸附在界面处。因此,表面诱导的降解被最小化。

[0112] 最常用的表面活性剂是脱水山梨糖醇聚乙氧基化物的非离子脂肪酸酯-即聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80(例如,在药物产品 **Avonex®**、**Neupogen®**、**Neulasta®**中)。两者的不同之处仅在于脂族链的长度,它们分别赋予分子C-12和C-18疏水特征。聚山梨醇酯80比聚山梨醇酯20具有更高的表面活性并且具有更低的临界胶束浓度。已显示聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80均防止搅动引起的聚集。聚山梨醇酯20和80还防止由冷冻、冻干和重构引起的压力。聚山梨醇酯20和80均可以含有可以氧化蛋白质的过氧化物,并且它们本身可以通过氧化或水解而降解,而对蛋白质的稳定性产生不同的影响。由于其在膜过滤期间的复杂行为(尤其是在聚山梨醇酯在溶液中形成胶束的浓度下),也可能难以控制配制品中聚山梨醇酯20或80的水平。表面活性剂泊洛沙姆188也已用于若干种市售的液体产品,诸如 **Gonal-F®**、**Norditropin®**和**Ovidrel®**。通常认为,非离子表面活性剂主要是通过蛋白质分子竞争疏水表面(例如,空气-水界面)而稳定蛋白质,从而防止蛋白质在这些疏水界面处解折叠。非离子表面活性剂还可以阻止蛋白质分子吸附到在加工期间存在的其他疏水表面上。此外,非离子表面活性剂可以直接与蛋白质分子中的疏水区域相互作用。与单独的缓冲液相比,单克隆抗体可以影响聚山梨醇酯20的临界胶束浓度。

[0113] 洗涤剂还可以影响蛋白质的热力学构象稳定性。在此同样地,给定赋形剂的作用将是蛋白质特异性的。例如,已显示聚山梨醇酯降低一些蛋白质的稳定性并增加其他蛋白质的稳定性。蛋白质的洗涤剂去稳定可以根据洗涤剂分子的疏水尾来合理解释,这些洗涤剂分子能以部分或完全解折叠的蛋白质状态进行特异性结合。这些类型的相互作用可以引起构象平衡向更扩展的蛋白质状态的转变(即,增加蛋白质分子的疏水部分的暴露以补充结合聚山梨醇酯)。可替代地,如果蛋白质天然状态展现出一些疏水表面,则与天然状态结合的洗涤剂可以稳定该构象。

[0114] 聚山梨醇酯的另一个方面是它们固有地易受氧化降解的影响。通常,作为原料,它们含有足够量的过氧化物以引起蛋白质残基侧链的氧化,尤其是甲硫氨酸。添加稳定剂引起的氧化性损伤的可能性强调了一点,即配制品中应使用最低有效浓度的赋形剂。对于表面活性剂,给定蛋白质的有效浓度将取决于稳定机制。已假定,如果表面活性剂稳定的机制与防止表面变性有关,则有效浓度将在洗涤剂的临界胶束浓度附近。相反,如果稳定机制与特定的蛋白质-洗涤剂相互作用相关,则有效的表面活性剂浓度将与蛋白质浓度和相互作

用的化学计量有关 (Randolph等人 (2002), Pharm Biotechnol. [药物生物技术], 13:159-75)。

[0115] 还能以适当的量添加表面活性剂以防止在冷冻和干燥期间表面相关的聚集 (Chang (1996), J.Pharm.Sci. [药物科学杂志] 85:1325)。示例性表面活性剂包括阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂、两性离子表面活性剂和两性表面活性剂, 包括衍生自天然存在的氨基酸的表面活性剂。阴离子表面活性剂包括但不限于十二烷基硫酸钠、磺基丁二酸钠二辛酯和丁二酸钠二辛酯、鹅去氧胆酸、N-月桂酰肌氨酸钠盐、十二烷基硫酸锂、1-辛烷磺酸钠盐、胆酸钠水合物、脱氧胆酸钠和甘氨酸脱氧胆酸钠盐。阳离子表面活性剂包括但不限于苯扎氯铵或苄索氯铵、氯化十六烷基吡啶一水合物和溴化十六烷基三甲铵。两性离子表面活性剂包括但不限于CHAPS、CHAPSO、SB3-10和SB3-12。非离子表面活性剂包括但不限于毛地黄皂苷、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20和TWEEN-80。在另一个实施例中, 表面活性剂包括聚桂醇400, 硬脂酸聚乙二醇40 (polyoxyl 40stearate), 聚氧乙烯氢化蓖麻油10、40、50和60, 单硬脂酸甘油酯, 聚山梨醇酯40、60、65和80, 大豆卵磷脂和其他磷脂 (诸如DOPC、DMPG、DMPC和DOPG); 蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。

[0116] 盐

[0117] 通常添加盐以增加配制品的离子强度, 这对于蛋白质溶解性、物理稳定性和等渗性可能是重要的。盐能以多种方式影响蛋白质的物理稳定性。离子可以通过与蛋白质表面上带电的残基结合来稳定蛋白质的天然状态。可替代地, 它们可以通过与沿蛋白质骨架的肽基团 (-CONH-) 结合来稳定变性状态。盐还可以通过屏蔽蛋白质分子内残基之间的排斥性静电相互作用来稳定蛋白质的天然构象。蛋白质配制品中的电解质还可以屏蔽可导致蛋白质聚集和不溶性的蛋白质分子之间的吸引力静电相互作用。

[0118] 盐对蛋白质的稳定性和溶解性的影响随离子种类的特性而显著变化。霍夫迈斯特序起源于19世纪80年代, 作为基于电解质沉淀蛋白质的能力对电解质进行排序的一种方法 (Cacace等人 (1997), Quarterly Reviews of Biophysics [生物物理学季评], 30 (3) :241-277)。在此报告中, 使用霍夫迈斯特序来说明离子和非离子共溶质对蛋白质稳定效应的规模。在表C中, 关于共溶质对溶液状态蛋白质的一般影响, 将共溶质从稳定 (亲液) 到去稳定 (离液) 排序。通常, 跨阴离子的影响差异远大于针对阳离子观察到的差异, 并且对于两种类型, 在高于肠胃外配制品中可接受的浓度下, 此类影响最为明显。通常使用高浓度的亲液剂 (kosmotrope) (例如, >1摩尔的硫酸铵) 通过称为“盐析”的过程从溶液中沉淀出蛋白质, 在该过程中亲液剂优先地从蛋白质表面排除, 从而降低了蛋白质在其天然 (折叠) 构象下的溶解性。除去或稀释盐将使蛋白质回到溶液。术语“盐溶”是指使用去稳定离子 (例如, 像胍和氯化物), 其通过使蛋白质骨架的肽键成为溶剂化物来增加蛋白质的溶解性。随着肽链的溶解性增加, 增加离液剂的浓度将有利于蛋白质的变性 (未折叠) 状态构象。离子对“盐溶”和“盐析”的相对有效性限定了其在霍夫迈斯特序中的位置。

[0119] 表4: 盐的霍夫迈斯特序

共溶质			稳定范围	
阴离子	阳离子	其他		
F ⁻	(CH ₃) ₄ N ⁺	甘油/山梨糖醇	稳定 (盐析)	亲液
PO ₄ ⁻	(CH ₃) ₂ NH ⁺	蔗糖/海藻糖		
SO ₄ ⁻	NH ₄ ⁺	TMAO		
CHCOO ⁻	K ⁺			
Cl ⁻	Na ⁺			
Br ⁻	Cs ⁺			
I ⁻	Li ⁺			
	Mg ²⁺	胍		
	Ca ²⁺	精氨酸		
	Ba ²⁺	尿素		

[0121] 为了在肠胃外配制品中维持等渗性,对于单价离子组合,盐浓度通常限于小于150mM。在此浓度范围内,盐稳定的机制可能是由于静电排斥分子内力或吸引力分子间力的屏蔽(德拜-休克尔(Debye-Huckel)屏蔽)。有趣的是,已显示通过此机制,在稳定蛋白质结构时离液盐比类似浓度的亲液剂更有效。据信离液阴离子比亲液离子具有更强的结合。关于共价蛋白质降解,通过德拜-休克尔理论预期了离子强度对此机制的不同影响。因此,已发表的氯化钠稳定蛋白质的报道伴随着氯化钠加速共价降解的那些报道。盐影响蛋白质稳定性的机制是蛋白质特异性的,并且可能会随着溶液pH的变化而显著变化。赋形剂可用于使得能够递送蛋白质药物的实例是一些高浓度抗体配制品的实例。在过去的几年中,已显示盐有效地降低此类配制品的粘度(Liu等人(2005,2006),*J.Pharm.Sci.*[*药物科学杂志*],94(9):1928-40,erratum in *J.Pharm.Sci.*[*药物科学杂志的勘误表*],95(1):234-5)。

[0122] 防腐剂

[0123] 当开发涉及从相同容器中多次提取的多次使用肠胃外配制品时,防腐剂是必需的。其主要功能是抑制微生物生长并确保在药物产品的整个保质期或使用期限内的产品无菌性。常用的防腐剂包括苯甲醇、苯酚和间甲酚。尽管防腐剂具有很长的使用历史,但包括防腐剂的蛋白质配制品的开发可能具有挑战性。防腐剂几乎总是对蛋白质具有去稳定效应(聚集),并且这已成为限制其在多剂量蛋白质配制品中使用的主要因素(Roy等人(2005),*J.Pharm.Sci.*[*药物科学杂志*],94(2):382-96)。还已显示苯甲醇以浓度、温度和时间依赖性方式影响蛋白质结构和稳定性。由于这些去稳定效应,许多冻干的蛋白质配制品用含有苯甲醇的稀释剂重构,以最小化在施用前与蛋白质的接触时间。

[0124] 大部分蛋白质药物仅配制用于一次性使用。然而,当多剂量配制品是可能的时,它们具有使患者方便的附加优势和增加的可销售性。一个好的实例是人生长激素(hGH),其中防腐配制品的开发已导致更方便、多次使用的注射笔呈现形式的商业化。至少四种含有hGH的防腐配制品的此类笔装置目前可获得。**Norditropin®**(液体)、**Nutropin AQ®**(液体)和健豪宁(Genotropin)(冻干-双室药筒)含有苯酚,而**Somatrop®**用间甲酚来配制。

[0125] 在防腐剂型的配制开发期间需要考虑若干个方面。必须优化药物产品中有效的防腐剂浓度。这要以赋予抗微生物有效性而不损害蛋白质稳定性的浓度范围测试剂型中给定的防腐剂。例如,使用差示扫描量热法(DSC),在开发用于白细胞介素-1受体(I型)的液体配制品中成功筛选了三种防腐剂。基于防腐剂在市售产品中常用的浓度下对稳定性的影响,对防腐剂进行排序(Remmele等人(1998),*Pharm.Res.*[药物研究],15(2):200-8)。

[0126] 正如可以预期的那样,含有防腐剂的液体配制品的开发比冻干配制品更具挑战性。冷冻干燥的产品可以在没有防腐剂的情况下冻干,并且在使用时用含有防腐剂的稀释剂重构。这缩短了防腐剂与蛋白质接触的时间,因此显著最小化相关的稳定性风险。在液体配制品的情况下,必须在整个产品保质期(通常约18-24个月)内保持防腐剂有效性和稳定性。要指出的重点是,防腐剂有效性必须在含有活性药物和所有赋形剂组分的最终配制品中得到证实。

[0127] 一些防腐剂会引起注射部位反应,这是选择防腐剂时需要考虑的另一个因素。在专注于评价**Norditropin®**中防腐剂和缓冲液的临床试验中,与含有间甲酚的配制品相比,观察到含有苯酚和苯甲醇的配制品的疼痛感觉降低(Kappelgaard(2004),*Horm.Res.*[激素研究]62增刊3:98-103)。有趣的是,在常用的防腐剂中,苯甲醇具有麻醉性质(Minogue和Sun(2005),*Anesth.Analg.*[麻醉与镇痛]100(3):683-6)。

[0128] 工作实例

[0129] 本文所论述和引用的所有出版物、专利和专利申请都通过引用以其整体特此并入。应理解,所披露的发明不限于所描述的特定方法学、方案和材料,因为这些可以变化。还应理解,本文所用的术语仅仅出于描述特定实施例的目的,并不旨在限制所附权利要求的范围。

[0130] 本领域技术人员将认识到,或能够仅使用常规试验确定本文所描述的本发明的具体实施例的许多等效内容。此类等效内容旨在由以下权利要求所涵盖。

[0131] 实例1

[0132] 此实验证实,通过调整填充重量目标,蛋白质浓度可以精确地针对各个重构药物产品。

[0133] 材料

[0134] • 缓冲液,其含有:甘露糖醇、蔗糖、L-组氨酸、聚山梨醇酯20,pH 5

[0135] • 容器小瓶,3cc、逆吹、I型玻璃、未处理、13mm带塞精细加工、13mm、4432/50V-50,

[0136] • 罗米司亭过滤纯化的物料

[0137] 方法

[0138] 1. 利用所需量的稀释缓冲液将药物稀释成目标产品配制品(0.5mg/mL)。

[0139] 2. 使用0.22 μ m聚偏氟乙烯(PVDF)过滤器将配制的溶液过滤。

- [0140] 3. 确保小瓶和塞子:3cc的小瓶已清洗并且去热原。
- [0141] 4. 填充足够数量的小瓶以达到各个填充重量目标:0.307、0.322、0.342、0.357、0.373g。
- [0142] 5. 部分塞住小瓶,并且置于冻干机中。
- [0143] 6. 在足够的冷冻、真空以及初级和次级干燥条件下运行所需的冻干循环,然后将冻干产品塞入密封小瓶中并卸载。
- [0144] 7. 用设定重构体积的0.32mL的注射用水重构产品。
- [0145] 8. 利用紫外线(UV)吸收测量小瓶中的所得蛋白质浓度。将吸光度定义为当特定波长的光通过分析物时被吸收的量。吸光度单位是分子固有吸光度、其浓度和分析物路径长度的函数。蛋白质分子中的芳香族氨基酸苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸吸收在260-290nm UV范围内的光。在此范围内的UV吸收通常用于测量溶液中蛋白质的存在。
- [0146] 9. 利用冰点降低测量产品的重量摩尔渗透压浓度。
- [0147] 10. 进行分析以确定经调整的填充重量目标对蛋白质和重量摩尔渗透压浓度的影响。
- [0148] 表5:填充重量和蛋白质浓度的总结

参数	实验条件	A	B	C	D	E
[0149] 输入	配制的物料浓度 (mg/mL)	0.528	0.528	0.528	0.528	0.528
	平均填充重量 (g)	0.307	0.322	0.342	0.357	0.373
输出	重构后的平均蛋白质浓度 (mg/mL)	0.459	0.484	0.518	0.546	0.565

[0150] 如图6所示,在重构蛋白浓度与填充体积之间观察到很强的线性关系,如通过 R^2 为0.9964所证明的。理论上可以基于蛋白质质量平衡来解释这种线性关系,如下所示:

$$[0151] \quad C_{\text{重构}} * V_{\text{重构}} = (C_{\text{配制}} - C_{\text{损失}}) * V_{\text{填充}} \quad [\text{等式1}]$$

$$[0152] \quad C_{\text{重构}} = \frac{C_{\text{配制}} - C_{\text{损失}}}{V_{\text{重构}}} * V_{\text{填充}} \quad [\text{等式2}]$$

[0153] 其中 $C_{\text{重构}}$ 是重构后的蛋白质浓度, $V_{\text{重构}}$ 是重构后的产品体积, $C_{\text{配制}}$ 是配制的物料蛋白质浓度, $C_{\text{损失}}$ 是由于与过滤器和容器结合的蛋白质损失,并且 $V_{\text{填充}}$ 是每个小瓶的填充体积。由于配制的物料浓度、蛋白质结合损失和重构体积在给定的运行中是恒定的,因此重构后的蛋白质浓度与填充体积成比例,如等式2所示。

[0154] 在中试规模实验中,在每种填充条件下使用10个重复来确定最终重构药物产品(DP)蛋白质浓度的可变性,如表6所示。因此,观察到的可变性代表过程可变性和分析可变性,包括与产品重构相关的可变性。

[0155] 表6:在每种填充条件下的蛋白质浓度(重构的)可变性

	A (-10%)	B (-5%)	C (目标)	D (+5%)	E (+10%)
[0156] 重复数	10	10	10	10	10
平均值 (mg/mL)	0.459	0.484	0.518	0.546	0.565
标准差 (SD, mg/mL)	0.0084	0.0133	0.0082	0.0052	0.0069
相对 SD (%)	1.83	2.76	1.58	0.94	1.23

[0157] 填充重量对重量摩尔渗透压浓度的影响(重构DP)

[0158] 针对以5个填充重量目标填充的小瓶,测试了重构后最终药物产品重量摩尔渗透压浓度的重量摩尔渗透压浓度。表7总结了填充前和重构后的重量摩尔渗透压浓度结果。基于在0.341克的目标填充重量下的结果,填充和重构后的重量摩尔渗透压浓度没有改变,这表明赋形剂没有大量损失。当重构体积保持恒定时,重量摩尔渗透压浓度在较高的填充体积下略有增加,而在较低的填充体积下略有降低。

[0159] 表7:填充重量和重量摩尔渗透压浓度的总结

参数		A	B	C	D	E
[0160] 输入	配制的物料重量摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg) *	312.4	312.4	312.4	312.4	312.4
	平均填充重量 (g)	0.307	0.322	0.342	0.357	0.373
	平均填充体积 (mL)	0.301	0.316	0.336	0.350	0.366
	归一化体积 (%)	89.9%	94.3%	100.2%	104.6%	109.3%
输出	重构后的有效体积 (mL)	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335
	重构后的平均重量摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg)	280	294	313	327	342
	归一化重量摩尔渗透压浓度 (%)	89.6%	94.0%	100.0%	104.6%	109.3%

[0161] 如果绘制出填充重量/体积(基于0.341g的目标归一化)与产品重量摩尔渗透压浓度(基于在目标填充重量下的313mOsm/kg的目标重量摩尔渗透压浓度归一化)的关系,会发现线性关系,如图7所示。这种线性关系可以通过重量摩尔渗透压浓度的定义及其与缓冲液组分浓度的关系来解释。

[0162] 重量摩尔渗透压浓度是溶质浓度的量度,定义为每千克溶剂的溶质的渗透压克分子(Osm)的数量(osmol/kg或Osm/kg)。与摩尔浓度(摩尔/升)不同,重量摩尔渗透压浓度测量溶质颗粒(诸如离解的离子)的摩尔数,而不是溶质的摩尔数。溶液的重量摩尔渗透压浓度可以由以下表达式计算:

[0163] 重量摩尔渗透压浓度 (osm/kg) = 密度 * $\sum \varphi_i n_i C_i$ [等式 3]

[0164] 其中 φ 是渗透系数, n 是分子解离的颗粒 (例如, 离子) 的数量, 并且 C 是溶质的摩尔浓度 (摩尔/升)。

[0165] 在填充重量 (或体积) 比目标体积高 10% 的情况下, 重构至恒定体积后, 配制品中每种赋形剂种类的浓度增加 10%。由于在已知配制品中 φ_i 和 n_i 是恒定的, 因此每种种类的浓度增加 10% 导致重量摩尔渗透压浓度增加 10%, 如等式 3 所示。类似地, 填充体积降低 10% 导致赋形剂浓度降低 10%, 并且因此重量摩尔渗透压浓度降低 10%。

[0166] 实例 2

[0167] 将蛋白质博纳吐单抗以 $55\mu\text{g}/\text{mL}$ 配制到 200mM L-赖氨酸-HCl、25mM 柠檬酸、15% (w/v) 海藻糖二水合物、0.1% (w/v) 聚山梨醇酯 80 (pH 7.0) 中。配制的蛋白质可允许范围是在过滤后的物料阶段测量的。使用范围从 $48.0\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 $65.0\mu\text{g}/\text{mL}$ 的物料浓度。基于测量的蛋白质浓度计算目标填充重量, 当用 3mL 的水重构时得到 $12.5\text{mcg}/\text{mL}$ 的重构药物产品。

[0168] $C_{\text{重构}} * V_{\text{重构}} = (C_{\text{配制}} - C_{\text{损失}}) * V_{\text{填充}}$

[0169] 其中

[0170] $C_{\text{重构}} * V_{\text{重构}} = \text{目标蛋白质含量}_{\text{重构}}$

[0171] 然后, 可以将目标蛋白质含量乘以产品密度, 并且除以测量的药物浓度 (如果需要, 针对由于结合的损失进行调整), 以确定目标填充重量。

[0172] 根据以下公式计算目标填充重量, 其中相应的填充重量范围为 0.634 至 0.858gm。

[0173] 填充重量 (g) =
$$\frac{\text{目标剂量} \left(38.5\mu \frac{\text{g}}{\text{小瓶}} \right) \times \text{密度} \left(1.07 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right)}{\text{DS} \text{ 浓度} \left(x \mu \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right)}$$

[0174] 其中 DS 是本领域普通技术人员通常所理解的, 是指原料药。更一般地说,

$$(\text{治疗性蛋白质的目标固定剂量}) \times (\text{密度})$$

[0175] 经调整的填充重量 =
$$\frac{\text{物料配制品中的治疗性蛋白质浓度。}}{\text{物料配制品中的治疗性蛋白质浓度。}}$$

[0176] 实例 3

[0177] 英利昔单抗药物产品具有 $20 \pm 1.5\text{mg}/\text{mL}$ 的英利昔单抗, 用 10mM 磷酸钠、10% (w/v) 蔗糖、0.01% (w/v) 聚山梨醇酯 80 (pH 7.2) 配制, 用 10mL 注射用水重构后而成。

[0178] 根据以下公式计算目标填充重量, 其中相应的填充重量范围为 4.85 至 5.63gm。

[0179] 目标填充重量的计算

[0180] 目标填充重量 (g) =
$$\frac{\left(\text{目标蛋白质含量} \left(100 \text{ mg} \right) \right) \times \left(\text{密度} \left(1.042 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) \right)}{\text{释放的原料药蛋白质浓度} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

[0181] 实例 4

[0182] 曲妥珠单抗具有 $21\text{mg}/\text{mL}$, 由 $0.303\text{mg}/\text{mL}$ L-组氨酸、 $0.470\text{mg}/\text{mL}$ L-组氨酸盐酸盐一水合物、 $19.1\text{mg}/\text{mL}$ α, α -海藻糖二水合物、 $0.0840\text{mg}/\text{mL}$ 聚山梨醇酯 20 (pH 6.1) 配制而成。根据以下公式计算目标填充重量, 并且基于产品递送要求改变填充重量范围。填充重量目

标的范围从3.1到21.2gm(取决于各个呈现形式)。此产品以21mg/mL的合并原料药浓度具有多种呈现形式。

[0183] 使用以下信息来计算此实例4和后续实例中每个药物产品批次的目标填充重量:

$$[0184] \quad \text{目标填充重量 [g]} = \frac{(\text{目标蛋白质含量 [mg]}) \times (\text{密度 [g/mL]})}{\text{合并的原料药浓度 [mg/mL]}}$$

作为一个实例, 150 mg 呈现形式的目标填充重量[g]

$$[0185] \quad = \frac{(156 \text{ mg}) \times (1.01 \text{ g/mL})}{\text{合并的原料药浓度 [21mg/mL]}}$$

作为另一个实例, 420 mg 呈现形式的目标填充重量[g]

$$[0186] \quad = \frac{(440 \text{ mg}) \times (1.01 \text{ g/mL})}{\text{合并的原料药浓度 [21mg/mL]}}$$

作为另外的实例, 60 mg 呈现形式的目标填充重量[g]

$$[0187] \quad = \frac{(65 \text{ mg}) \times (1.01 \text{ g/mL})}{\text{合并的原料药浓度 [21mg/mL]}}$$

[0188] 实例5

[0189] AMG 701是单链可变结构域双特异性T细胞衔接器(BiTE®)抗BCMA/抗CD3抗体构建体(参见NCI Drug Dictionary [NCI药物词典]和其他参考文献)。用10mM L-谷氨酸、9.0% (w/v) 蔗糖、0.010% (w/v) 聚山梨醇酯80 (pH 4.2) 以1mg/mL的蛋白质浓度配制AMG 701。根据以下公式计算目标填充重量, 并且基于产品递送要求改变填充重量范围。AMG 701具有三种呈现形式, 其中填充重量目标范围为: 第一呈现形式从0.47至0.57gm, 第二呈现形式从1.60至1.96gm, 并且第三呈现形式从3.28至4.01gm。

[0190] 对于第一呈现形式:

$$[0191] \quad \text{目标填充重量 (g)} = \frac{(\text{目标蛋白质含量 (0.50 mg)}) \times (\text{密度 (1.032 } \frac{\text{g}}{\text{mL}}))}{\text{释放的原料药蛋白质浓度 (1.0 } \frac{\text{mg}}{\text{mL}})}$$

[0192] 对于第二呈现形式:

$$[0193] \quad \text{目标填充重量 (g)} = \frac{(\text{目标蛋白质含量 (1.71 mg)}) \times (\text{密度 (1.032 } \frac{\text{g}}{\text{mL}}))}{\text{释放的原料药蛋白质浓度 (1.0 } \frac{\text{mg}}{\text{mL}})}$$

[0194] 对于第三呈现形式:

$$[0195] \quad \text{目标填充重量 (g)} = \frac{(\text{目标蛋白质含量 (3.5 mg)}) \times (\text{密度 (1.032 } \frac{\text{g}}{\text{mL}}))}{\text{释放的原料药蛋白质浓度 (1.0 } \frac{\text{mg}}{\text{mL}})}$$

[0196] 实例6

[0197] AMG 330是抗CD33/抗CD3单链可变结构域双特异性T细胞衔接器(BiTE®) (参见NCI Drug Dictionary [NCI药物词典]和其他参考文献)。用10mM磷酸钾、8.0% (w/v) 蔗糖、

1.0% (w/v) 磺基丁基醚β环糊精 (SBE-CD)、0.010% (w/v) 聚山梨醇酯80 (pH 6.1) 以0.5mg/mL的蛋白质浓度配制AMG 300。根据以下公式计算目标填充重量,并且基于产品递送要求改变填充重量范围。填充重量目标的范围从1.2到1.5gm。如下计算目标填充重量:

$$[0198] \quad \text{目标填充重量 (g)} = \frac{\left(\text{目标蛋白质含量 (0.64 mg)} \right) \times \left(\text{密度} \left(1.033 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) \right)}{\text{原料药蛋白质浓度} \left(0.5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

[0199] 通常,该方法学可以用于以下情况:容器中需要目标量的产品,以确保重构后的产品处于所需浓度。此结果是通过确定重构产品的体积的量来实现的;例如,具有所需浓度为1mg/mL的治疗性蛋白质的1mL体积使得所需蛋白质含量的总量为1mg。

[0200] 目标蛋白质含量 [mg] = (蛋白质浓度 [mg/mL] × 重构体积 [mL])

[0201] 然后基于以下公式使用目标蛋白质含量计算目标填充重量。典型地将过程中或测量的药物浓度作为配制过程的一部分进行测量,以补偿任何过程可变性。在一些情况下,调整目标蛋白质含量以补偿由于结合的产品损失。所测量的药物浓度的可信度需要确保精确地针对填充重量。

$$[0202] \quad \text{目标填充重量 [g]} = \frac{\left(\text{目标蛋白质含量 [mg]} \right) \times \left(\text{密度 [g/mL]} \right)}{\text{测量的药物浓度 [mg/mL]}}$$

[0203] 这是一个具体实例,因为用于过程中浓度和重构产品的治疗性产品的范围可以从微克 (mcg或μg) /毫升 (mL) 到毫克 (mg) /毫升 (mL)。

[0204] 如上所论述的(基于实验结果),需要验证重量摩尔渗透压浓度。与填充重量目标组合地确定对允许的测量的药物浓度的限制,以达到填充到容器中所需量的活性药物,以提供重构产品满足产品(活性药物或蛋白质)浓度以及重量摩尔渗透压浓度规格限制的保证。

[0205] 本文所论述和引用的所有出版物、专利和专利申请都通过引用以其整体特此并入。应理解,所披露的发明不限于所描述的特定方法学、方案和材料,因为这些可以变化。还应理解,本文所用的术语仅仅出于描述特定实施例的目的,并不旨在限制所附权利要求的范围。

[0206] 本领域技术人员将认识到,或能够仅使用常规试验确定本文所描述的本发明的具体实施例的许多等效内容。此类等效内容旨在由以下权利要求所涵盖。

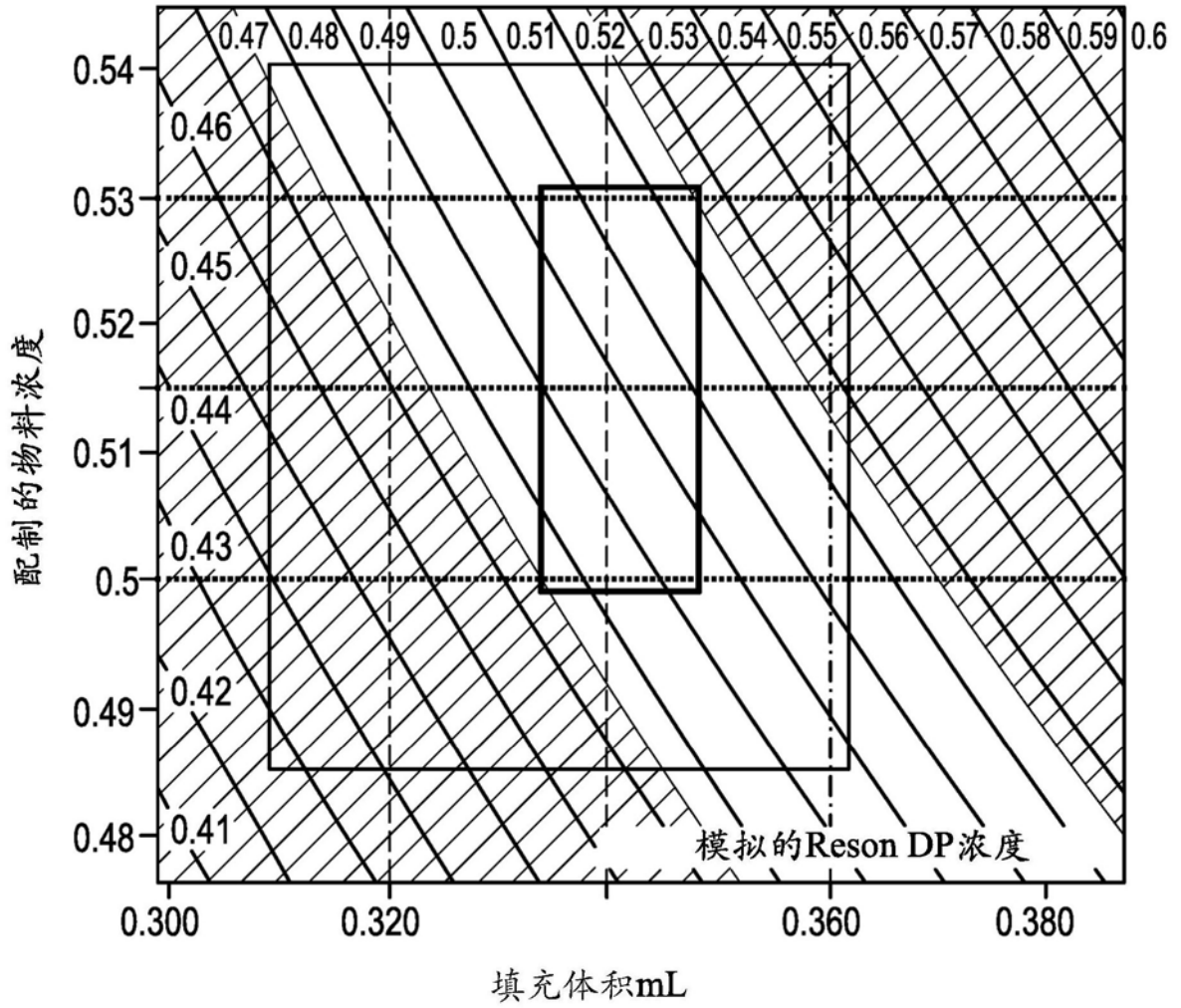


图1

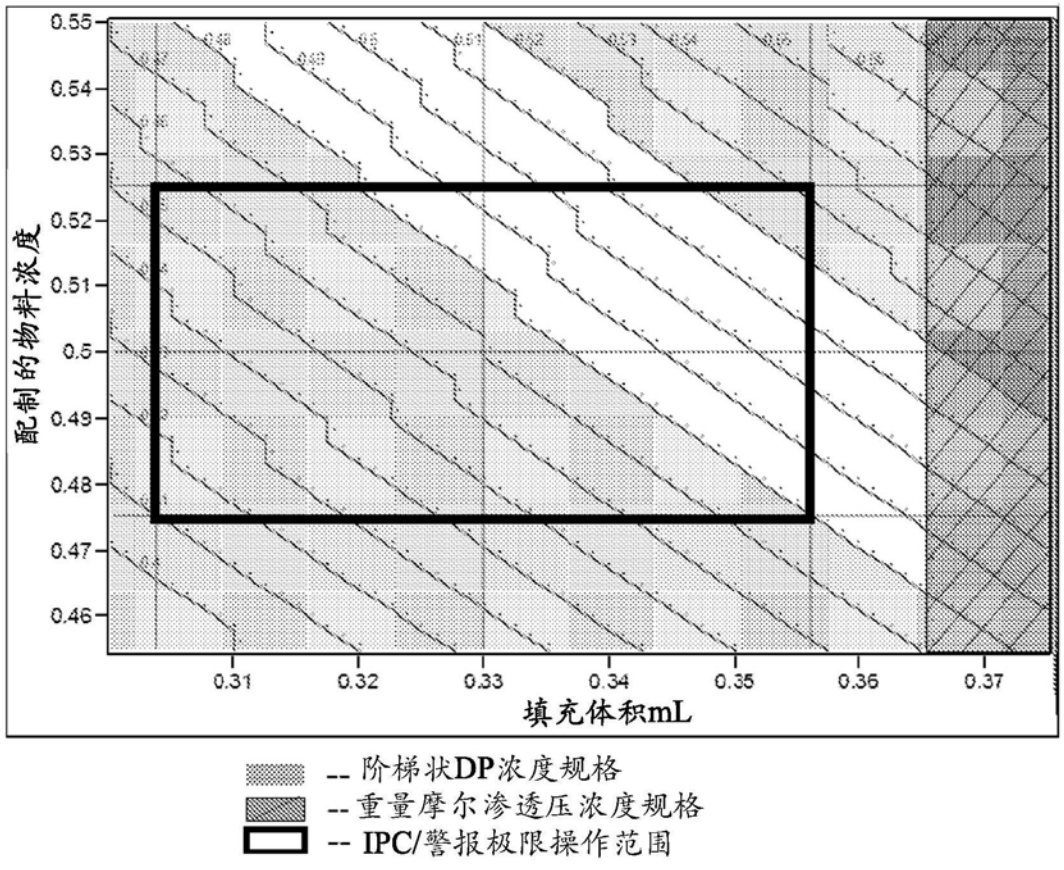


图2

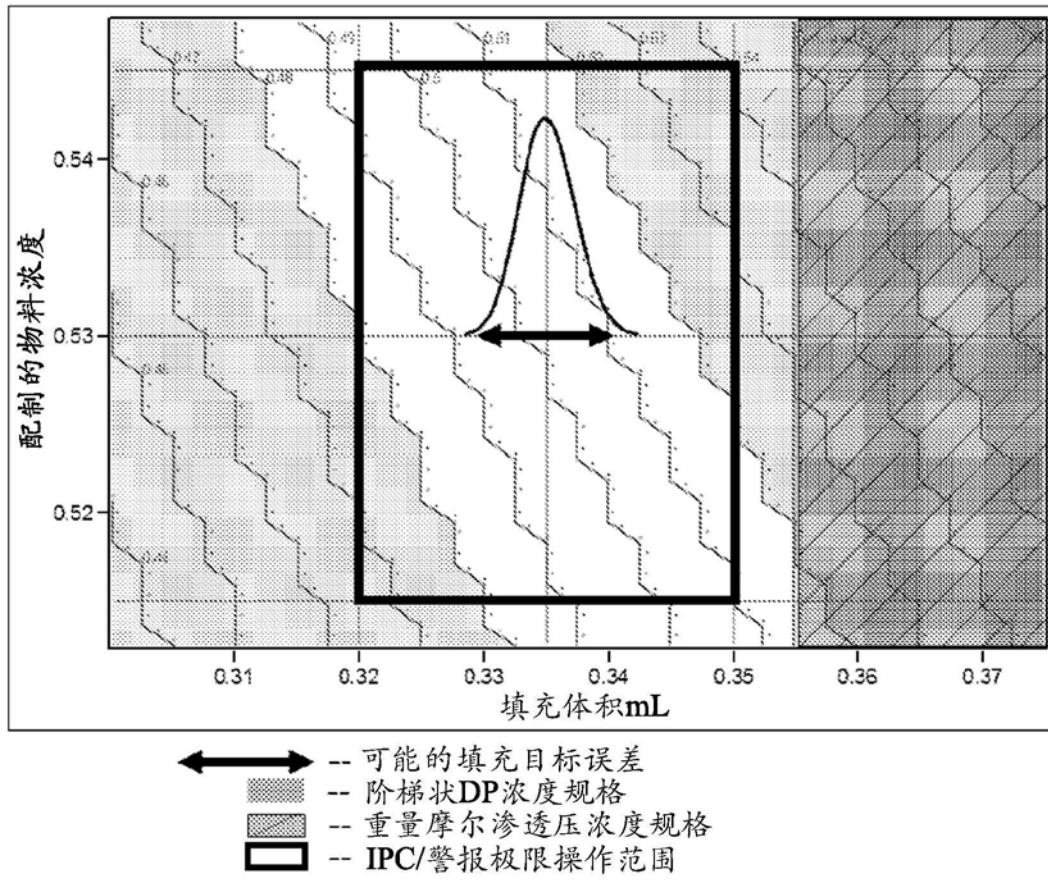


图3

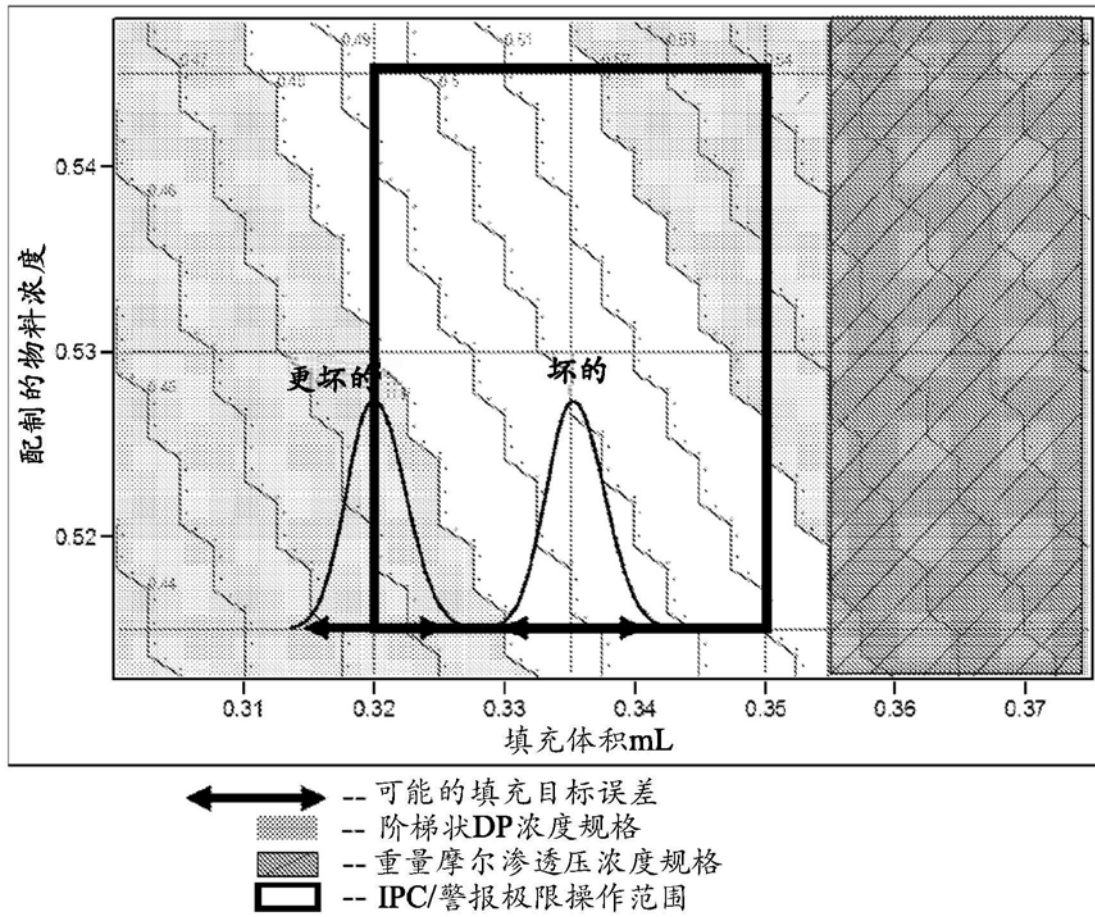


图4

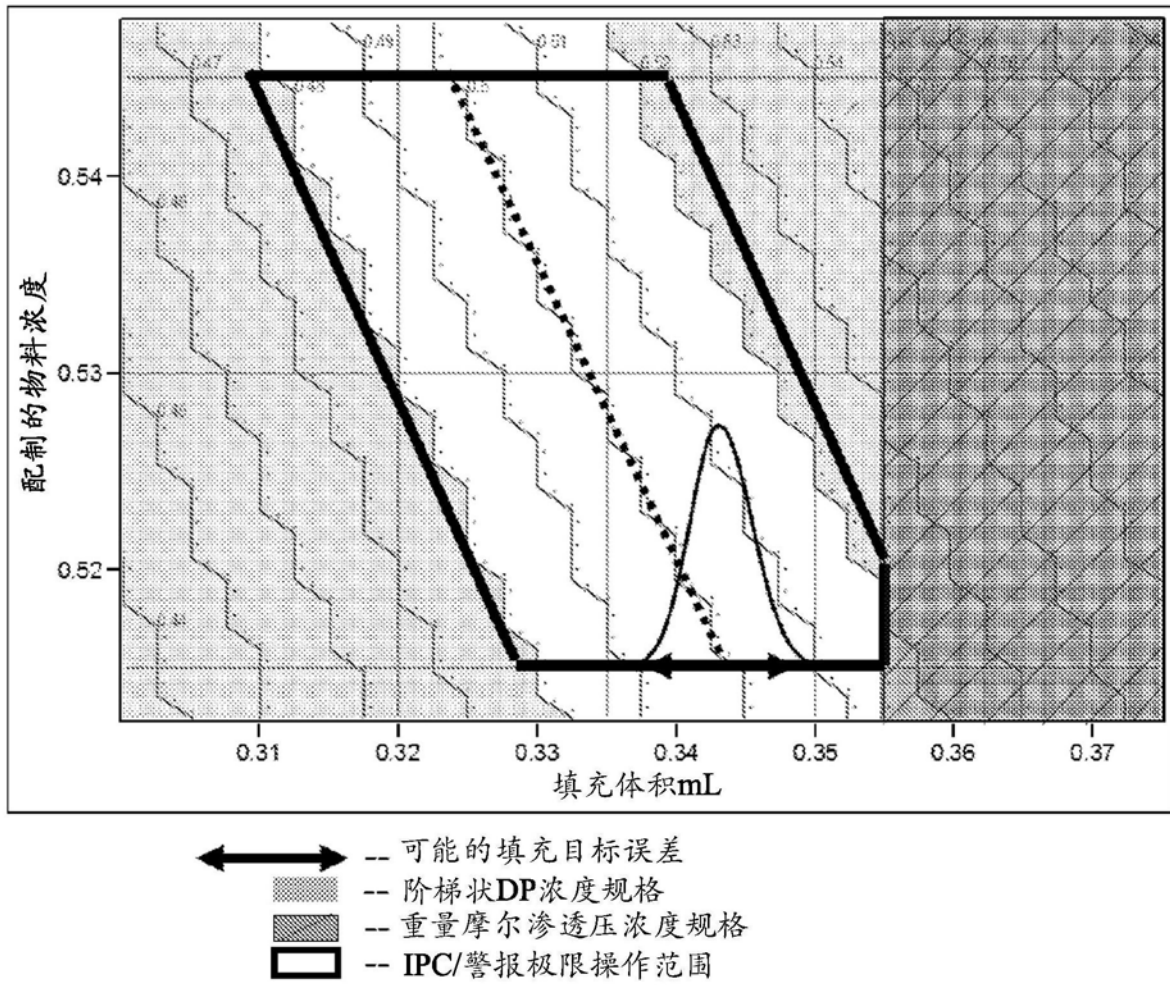


图5

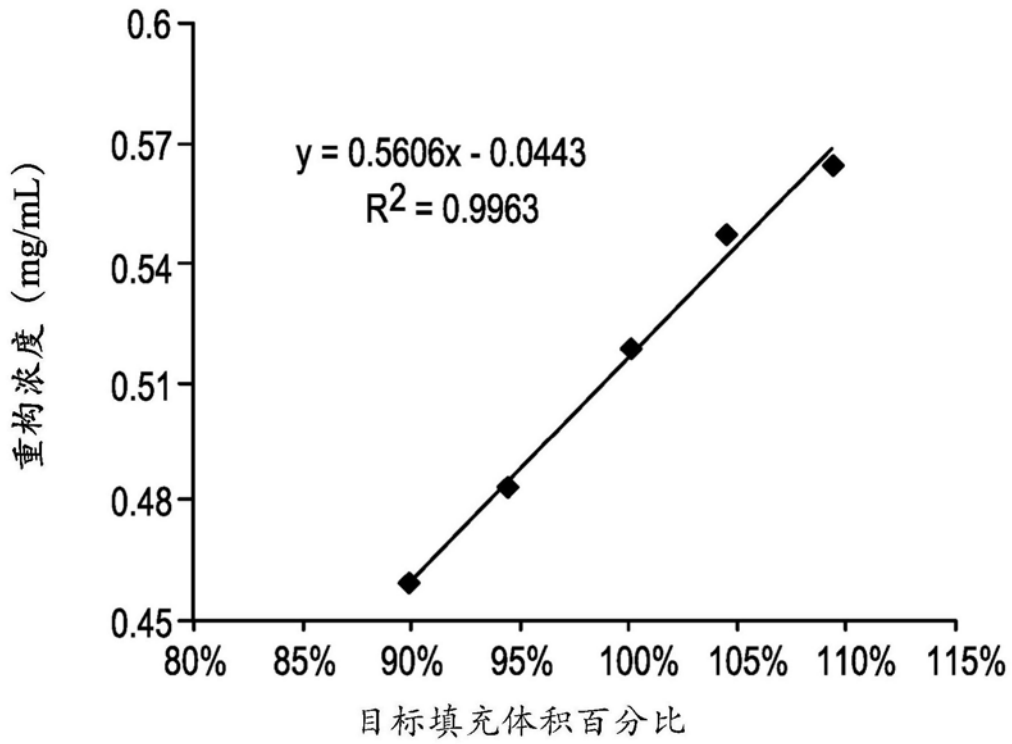


图6

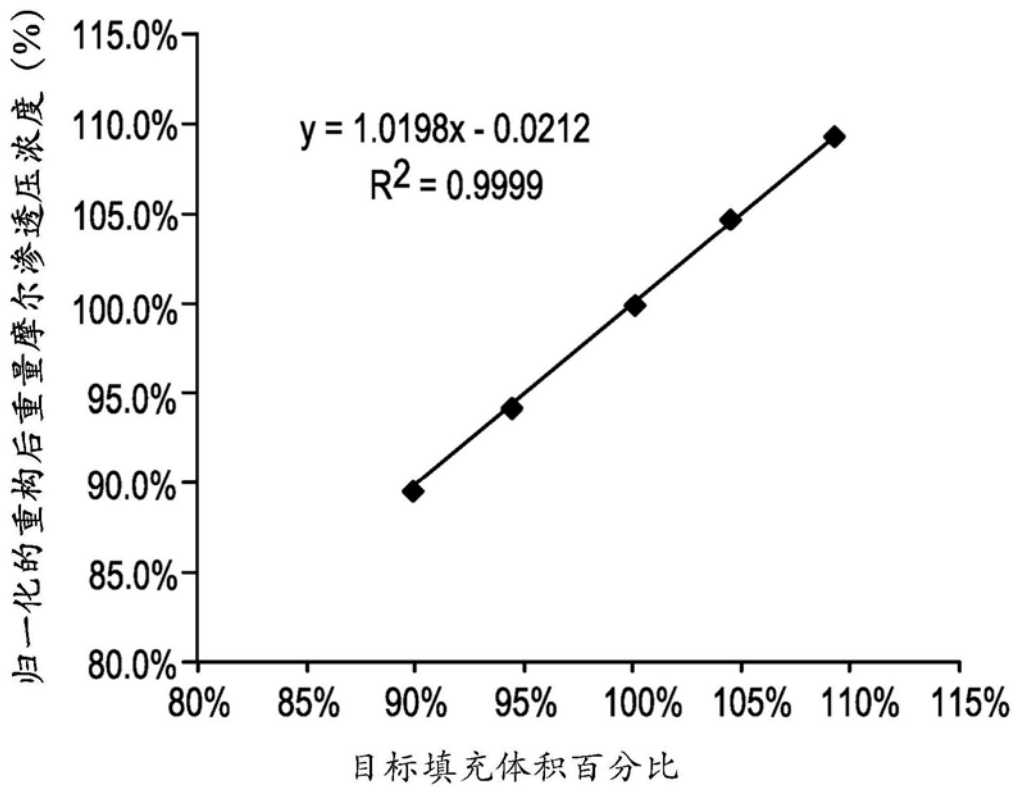


图7