



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118613503 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 06

(21) 申请号 202280089597.4

(22) 申请日 2022.12.21

(30) 优先权数据

2021-207714 2021.12.22 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/047035 2022.12.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/120561 JA 2023.06.29

(71) 申请人 中外制药株式会社

地址 日本

(72) 发明人 细口健作 原爱 增田宗太

高城美智 南部周介 佐藤久美

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

专利代理师 周蕾 张国梁

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

B01J 20/281 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

权利要求书3页 说明书24页

序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

生物学活性降低的抗体变体

(57) 摘要

在一个非限制性实施方案中,本发明提供了奈莫利珠单抗的产品变体(抗体变体),特别是具有比奈莫利珠单抗更低生物学活性的产品变体。本发明还提供了包含变体的含有奈莫利珠单抗的组合物、减少变体的方法和分析变体的方法。

1. 具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体的变体,其中
 - (a) 从上述序列N端起位置1处的氨基酸残基D,
 - (b) 从上述序列N端起位置4处的氨基酸残基D,或
 - (c) 从上述序列N端起位置5处的氨基酸残基D是琥珀酰亚胺残基或异天冬氨酸残基。
2. 权利要求1所述的抗体变体,其中所述序列是CDR序列。
3. 权利要求1所述的抗体变体,其中所述序列为重链中包含的序列。
4. 权利要求1所述的抗体变体,其中具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的所述抗体为:
 - (1) 抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1所示的CDR1、SEQ ID NO:2所示的CDR2和SEQ ID NO:3所示的CDR3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4所示的CDR1、SEQ ID NO:5所示的CDR2和SEQ ID NO:6所示的CDR3;
 - (2) 抗体,其包含SEQ ID NO:7所示的重链可变区和SEQ ID NO:8所示的轻链可变区;或
 - (3) 抗体,其包含SEQ ID NO:9所示的重链和SEQ ID NO:10所示的轻链。
5. 权利要求1-4中任一项所述的抗体变体,其中具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的所述抗体是奈莫利珠单抗。
6. 权利要求1-5中任一项所述的抗体变体,当使用阴离子交换色谱分离时,其保留时间比具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的所述抗体短。
7. 权利要求1-6中任一项所述的抗体变体,其生物学活性低于具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的所述抗体。
8. 包含权利要求1-7中任一项所述的抗体变体的药物组合物。
9. 包含权利要求1-7中任一项所述的抗体变体的药物组合物,其中所述药物组合物中含有异天冬氨酸残基的抗体变体与抗体变体和未修饰抗体之和的比率为36%或更低,和/或,在酶消化后,源自抗体变体的含有异天冬氨酸残基的肽与含有异天冬氨酸残基的肽和相应的未修饰肽之和的比率为20%或更低。
10. 包含权利要求1-7中任一项所述的抗体变体的药物组合物,其中当使用阴离子交换色谱分离药物组合物时,包含含有异天冬氨酸残基的抗体变体的峰面积与总峰面积的比率为40.3%或更小。
11. 包含权利要求1-7中任一项所述的抗体变体的药物组合物,其中所述药物组合物中含有琥珀酰亚胺残基的抗体变体与未修饰抗体的比率为36%或更低,和/或,在酶消化后,源自抗体变体的含有琥珀酰亚胺残基的肽与含有琥珀酰亚胺残基的肽和相应的未修饰肽之和的比率为20%或更低。
12. 包含权利要求1-7中任一项所述的抗体变体的药物组合物,其中当使用阴离子交换色谱分离药物组合物时,包含含有异天冬氨酸残基的抗体变体的峰面积与总峰面积的比率为29.1%或更小。
13. 权利要求8-12中任一项所述的药物组合物,其包含奈莫利珠单抗。
14. 检测权利要求1-7中任一项所述的抗体变体的方法,其包括通过亲和色谱、离子交换色谱、正相色谱、反相色谱、亲水相互作用色谱 (HILIC)、疏水相互作用色谱 (HIC)、基于电荷的分离、尺寸排阻色谱 (SEC)、凝胶渗透色谱 (GPC) 或其组合分离样品的步骤,所述样品包

含具有含有氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体或经酶处理过的该抗体。

15.权利要求14所述的方法,其中所述离子交换色谱为阴离子交换色谱。

16.权利要求15所述的方法,其中所述阴离子交换色谱使用内径为4.6-7.5mm,长度为35-150mm,粒径为2.5-10 μ m的柱,柱温为25-50 $^{\circ}$ C,并用pH6.0-10.0的流动相进行洗脱。

17.权利要求14-16中任一项所述的方法,其在分离包含经酶处理过的该抗体的样品的步骤之后,包括通过质谱和/或UV吸收测量来定量肽的步骤。

18.生产包含奈莫利珠单抗的组合物的方法,其包括执行权利要求14-17中任一项所述方法的步骤。

19.生产包含奈莫利珠单抗的组合物的方法,其包括通过亲和色谱、离子交换色谱、亲水相互作用色谱(HILIC)、疏水相互作用色谱(HIC)、基于电荷的分离、尺寸排阻色谱(SEC)、凝胶渗透色谱(GPC)或其组合纯化含有奈莫利珠单抗的溶液的步骤。

20.权利要求19所述的方法,其中纯化步骤包括通过亲和色谱纯化从产生奈莫利珠单抗的细胞获得的包含奈莫利珠单抗的组合物。

21.权利要求20所述的方法,其中通过亲和色谱纯化后含有奈莫利珠单抗的溶液的存放时间为72小时或更短,并且在组合物中权利要求1-7中任一项所述的抗体变体的含量低于存放时间更长时的含量。

22.降低权利要求1-7中任一项所述抗体变体的含量的方法,其包括通过亲和色谱纯化含有抗体的组合物的步骤,所述组合物是从产生具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体的细胞中获得的。

23.权利要求22所述的方法,其中通过亲和色谱纯化后含有奈莫利珠单抗的溶液的存放时间为72小时或更短,并且在组合物中权利要求1-7中任一项所述的抗体变体的含量低于存放时间更长时的含量。

24.奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由奈莫利珠单抗的两条重链形成的结构,所述两条重链通过重链中EU编号位置224处的半胱氨酸相互连接。

25.奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由奈莫利珠单抗的两条轻链形成的结构,所述两条轻链通过轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸相互连接。

26.奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由奈莫利珠单抗的一条轻链和一条重链形成的结构,其中轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸与重链中EU编号位置224处的半胱氨酸连接,重链中EU编号位置227和230处的半胱氨酸在单个重链内连接。

27.奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由一条轻链形成的结构,其中奈莫利珠单抗的轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸与游离半胱氨酸连接。

28.奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由奈莫利珠单抗的两条重链和一条轻链形成的结构,其中两条重链通过两个位置的半胱氨酸相互连接:EU编号位置227和230;第一重链中EU编号位置224处的半胱氨酸与轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸连接,第二重链中EU编号位置224处的半胱氨酸与游离半胱氨酸连接。

29.药物组合物,其包含权利要求24-28中任一项所述的抗体变体,其中药物组合物中抗体变体在总抗体分子中的比例为11.0CPA%或更低。

30.奈莫利珠单抗的抗体变体,其中奈莫利珠单抗的重链中Kabat编号位置55处的天冬

酰胺是脱酰胺的。

31. 包含权利要求30所述的抗体变体的药物组合物,其中酶消化药物组合物后源自抗体变体的含有脱酰胺的肽与含有脱酰胺的肽和相应未修饰肽之和的比率为2.0%或更低。

生物学活性降低的抗体变体

技术领域

[0001] 本发明涉及奈莫利珠单抗的抗体变体,例如,与奈莫利珠单抗相比具有低生物学活性的抗体变体。本发明还涉及具有低含量此类抗体变体的药物组合物。本发明还涉及用于检测此类抗体变体的方法和用于分析此类抗体变体的方法。

背景技术

[0002] 抗体因其在血浆中的高稳定性和较少的副作用而作为药物引起人们的关注。特别是,市场上有许多IgG型抗体药物,目前也有大量抗体药物正在开发中。通常,抗体药物除了含有作为活性成分的所需物质(抗体)外,还含有包括源自所需物质的产物变体(抗体变体)的各种成分。此类产品变体分为具有与所需物质相当的功效和安全性的产品相关物质和不具有与所需物质相当的功效和安全性的产品相关杂质。一些变体是根据生产原料药过程的条件以不同的速率产生。由于抗体药物中存在这种异质性,因此针对每种成分,需要为原料药和药物产品设定释放规格和保质期规格,并控制抗体药物的质量。

[0003] 近年来,发现了与白细胞介素31(IL-31)受体A(IL-31RA)结合并具有抑制IL-31与IL-31A结合功能的单克隆抗体(专利文献(PTL)1-3)。其中,抗IL-31RA抗体奈莫利珠单抗(CIM331)充当IL-31拮抗剂,并抑制IL-31的功能,IL-31被认为是诱导瘙痒的细胞因子。因此,它接受了针对特应性皮炎患者的临床试验,其结果最近已有报道(非专利文献(NPL)1)。然而,与奈莫利珠单抗抗体相比,生物学活性降低的抗体变体是否在奈莫利珠单抗的原料药和药物产品的生产过程中产生,以及它们所包含的此类变体的百分比,目前尚未见报道。

[0004] 引文列表

[0005] [专利文献]

[0006] [PTL 1]W02007/142325

[0007] [PTL 2]W02009/072604

[0008] [PTL 3]W02010/064697

[0009] [非专利文献]

[0010] [NPL 1]N Engl J Med 2020;383:141-150

发明内容

[0011] 技术问题

[0012] 本发明是鉴于上述情况而作出的。本发明的目的是提供奈莫利珠单抗的产物变体(抗体变体),含有奈莫利珠单抗的组合物(含有此类抗体变体)和产生此类组合物的方法,减少此类抗体变体的方法以及分析此类抗体变体的方法。

[0013] 问题的解决方案

[0014] 作为实现上述目标的专门研究的结果,本发明人成功鉴定了含有奈莫利珠单抗作为活性成分的药物组合物中所含的抗体变体(奈莫利珠单抗的产品变体)。发明人还发现,这些抗体变体包括与奈莫利珠单抗相比,具有低生物学活性(通过与IL-31受体结合抑制

IL-31信号传导的活性)的那些。此外,发明人发现了有效检测和分析抗体变体的方法。

[0015] 本公开是基于这些发现,并且在一个非限制性实施方案中涉及以下:

[0016] [1]具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体的变体,其中

[0017] (a)从上述序列N端起位置1处的氨基酸残基D,

[0018] (b)从上述序列N端起位置4处的氨基酸残基D,或

[0019] (c)从上述序列N端起位置5处的氨基酸残基D

[0020] 是琥珀酰亚胺残基或异天冬氨酸残基。

[0021] [2][1]的抗体变体,其中所述序列是CDR序列。

[0022] [2.2][1]的抗体变体,其中所述序列是CDR3序列。

[0023] [3][1]的抗体变体,其中所述序列是重链中包含的序列。

[0024] [4][1]的抗体变体,其中具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的所述抗体是:

[0025] (1)抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1所示的CDR1、SEQ ID NO:2所示的CDR2和SEQ ID NO:3所示的CDR3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4所示的CDR1、SEQ ID NO:5所示的CDR2和SEQ ID NO:6所示的CDR3;

[0026] (2)抗体,其包含SEQ ID NO:7所示的重链可变区和SEQ ID NO:8所示的轻链可变区;或

[0027] (3)抗体,其包含SEQ ID NO:9所示的重链和SEQ ID NO:10所示的轻链;

[0028] [5][1]的抗体变体,其中具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的所述抗体是奈莫利珠单抗。

[0029] [6][1]-[5]中任一项的抗体变体,当使用阴离子交换色谱分离时,其保留时间比具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体短。

[0030] [7][1]-[6]中任一项的抗体变体,其生物学活性低于具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体。

[0031] [1.2.0]包含[1]-[7]中任一项的抗体变体的药物组合物。

[0032] [1.2.1]包含[1]-[7]中任一项的抗体变体的药物组合物,其中所述药物组合物中含有异天冬氨酸残基的抗体变体与抗体变体和未修饰抗体之和的比率为36%或更低,和/或,在酶消化后,源自抗体变体的含有异天冬氨酸残基的肽与含有异天冬氨酸残基的肽和相应的未修饰肽之和的比率为20%或更低。

[0033] [1.2.2]包含[1]-[7]中任一项的抗体变体的药物组合物,其中所述药物组合物中含有异天冬氨酸残基的抗体变体与抗体变体和未修饰抗体之和的比率为27.8%或更低,和/或,在酶消化后,源自抗体变体的含有异天冬氨酸残基的肽与含有异天冬氨酸残基的肽和相应的未修饰肽之和的比率为15%或更低。

[0034] [1.2.3]包含[1]-[7]中任一项的抗体变体的药物组合物,其中所述药物组合物中含有异天冬氨酸残基的抗体变体与抗体变体和未修饰抗体之和的比率为17.9%或更低,和/或,在酶消化后,源自抗体变体的含有异天冬氨酸残基的肽与含有异天冬氨酸残基的肽和相应的未修饰肽之和的比率为9.4%或更低。

[0035] [1.2.4]包含[1]-[7]中任一项抗体变体的药物组合物,其中当使用阴离子交换色

谱分离药物组合物时,包含含有异天冬氨酸残基的抗体变体的峰面积与总峰面积的比率为40.3面积%或更小、30.4面积%或更小、或19.3面积%或更小。

[0036] [1.2.5] [1.2.1] - [1.2.4] 中任一项所述的药物组合物,其包含奈莫利珠单抗。

[0037] [1.2.6] 包含 [1] - [7] 中任一项的抗体变体的药物组合物,其中所述药物组合物中含有琥珀酰亚胺残基的抗体变体与抗体变体和未修饰抗体之和的比率为36%或更低,和/或,在酶消化后,源自抗体变体的含有琥珀酰亚胺残基的肽与含有琥珀酰亚胺残基的肽和相应的未修饰肽之和的比率为20%或更低。

[0038] [1.2.7] 包含 [1] - [7] 中任一项的抗体变体的药物组合物,其中所述药物组合物中含有琥珀酰亚胺残基的抗体变体与抗体变体和未修饰抗体之和的比率为27.8%或更低,和/或,在酶消化后,源自抗体变体的含有琥珀酰亚胺残基的肽与含有琥珀酰亚胺残基的肽和相应的未修饰肽之和的比率为15%或更低。

[0039] [1.2.8] 包含 [1] - [7] 中任一项的抗体变体的药物组合物,其中所述药物组合物中含有琥珀酰亚胺残基的抗体变体与抗体变体和未修饰抗体之和的比率为18.7%或更低,和/或,在酶消化后,源自抗体变体的含有琥珀酰亚胺残基的肽与含有琥珀酰亚胺残基的肽和相应的未修饰肽之和的比率为9.8%或更低。

[0040] [1.2.9] 包含 [1] - [7] 中任一项抗体变体的药物组合物,其中当使用阴离子交换色谱分离药物组合物时,包含含有琥珀酰亚胺残基的抗体变体的峰面积与总峰面积的比率为29.1面积%或更小、21.6面积%或更小、或13.8面积%或更小。

[0041] [1.2.10] [1.2.6] - [1.2.9] 中任一项所述的药物组合物,其包含奈莫利珠单抗。

[0042] [1.2.11] [1.2.0] - [1.2.9] 中任一项所述的药物组合物,其用于治疗 and/或预防特应性皮炎、透析瘙痒症和其他瘙痒症中的至少一种。

[0043] [1.2.12] 治疗或预防特应性皮炎、透析瘙痒症和其他瘙痒症中至少一种的方法,其包括施用 [1.2.0] - [1.2.9] 中任一项的药物组合物。

[0044] [1.3.1] 检测 [1] - [7] 中任一项抗体变体的方法,其包括通过亲和色谱、离子交换色谱、正相色谱、反相色谱、亲水相互作用色谱 (HILIC)、疏水相互作用色谱 (HIC)、基于电荷的分离、尺寸排阻色谱 (SEC)、凝胶渗透色谱 (GPC) 或其组合分离样品的步骤,所述样品包含具有含有氨基酸序列 DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3) 的可变区的抗体,或经酶处理过的该抗体。

[0045] [1.3.2] [1.3.1] 所述的方法,其中离子交换色谱为阴离子交换色谱。

[0046] [1.3.3] [1.3.2] 所述的方法,其中阴离子交换色谱使用内径为4.6-7.5mm,长度为35-150mm,粒径为2.5-10 μ m的柱,柱温为25-50 $^{\circ}$ C,并用pH6.0-10.0的流动相进行洗脱。

[0047] [1.3.4] [1.3.2] 或 [1.3.3] 所述的方法,其中阴离子交换色谱使用内径为7.5mm、长度为75mm、粒径为2.5 μ m的柱,柱温为40 $^{\circ}$ C,并用pH7.5 (包含250mmol/L氯化钠) 的流动相进行洗脱。

[0048] [1.3.5] [1.3.1] - [1.3.4] 中任一项所述的方法,其包括在分离包含经酶处理过的该抗体的样品的步骤之后,通过质谱和/或紫外吸收测量来定量肽的步骤。

[0049] [1.3.6] [1.3.1] - [1.3.5] 中任一项所述的方法,其中 [1] - [7] 中任一项的抗体变体用作标准物质 (标准品) 使用。

[0050] [1.4.1] 生产包含奈莫利珠单抗的组合物方法,其包括执行 [1.3.1] - [1.3.6] 中

任一项的方法的步骤。

[0051] [1.4.2]生产包含奈莫利珠单抗的组合物的方法,其包括通过亲和色谱、离子交换色谱、亲水相互作用色谱(HILIC)、疏水相互作用色谱(HIC)、基于电荷的分离、尺寸排阻色谱(SEC)、凝胶渗透色谱(GPC)或其组合纯化包含奈莫利珠单抗的溶液的步骤。

[0052] [1.4.3][1.4.2]所述的方法,其中纯化步骤包括通过亲和色谱纯化从产生奈莫利珠单抗的细胞获得的包含奈莫利珠单抗的组合物。

[0053] [1.4.4][1.4.3]所述的方法,其中通过亲和色谱纯化后含有奈莫利珠单抗的溶液的存放时间为72小时或更短,并且组合物中[1]-[7]中任一项的抗体变体的含量低于存放时间更长时的含量。

[0054] [1.4.5][1.4.4]所述的方法,其中通过亲和色谱纯化后含有奈莫利珠单抗的溶液的存放时间为约24小时或更短。

[0055] [1.4.6][1.4.1]-[1.4.5]中任一项所述的方法,其中[1]-[7]中任一项的抗体变体用作标准物质(标准品)使用。

[0056] [1.5.1.1]降低[1]-[7]中任一项所述抗体变体的含量的方法,其包括通过亲和色谱纯化含有抗体的组合物的步骤,所述组合物是从产生具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体的细胞中获得的,其中组合物中[1]-[7]中任一项的抗体变体的含量低于所述方法不包括纯化步骤时的含量。

[0057] [1.5.1.2][1.5.1.1]所述的方法,其中通过亲和色谱纯化后含有奈莫利珠单抗的溶液的存放时间为48小时或更短,并且组合物中[1]-[7]中任一项的抗体变体的含量低于存放时间更长时的含量。

[0058] [1.5.1.3][1.5.1.2]所述的方法,其中通过亲和色谱纯化后含有奈莫利珠单抗的溶液的存放时间为约24小时或更短。

[0059] [1.5.1.4][1.5.1.1]-[1.5.1.3]中任一项所述的方法,其中[1]-[7]中任一项的抗体变体用作标准物质(标准品)使用。

[0060] [1.6.1.1]包含[1]-[7]中任一项所述抗体变体的组合物,其中当使用阴离子交换色谱分离时,抗体变体比奈莫利珠单抗具有更短的保留时间,并且包含比奈莫利珠单抗更多的异天冬氨酸残基。

[0061] [1.6.1.2][1.6.1.1]所述的组合物,其中抗体变体的含量为40.3面积%或更小、30.4面积%或更小、或19.3面积%或更小,并且其中所述组合物包含奈莫利珠单抗。

[0062] [1.6.2.1]包含[1]-[7]中任一项所述抗体变体的组合物,其中当使用阴离子交换色谱分离时,抗体变体比奈莫利珠单抗具有更短的保留时间,并且包含比奈莫利珠单抗更多的琥珀酰亚胺残基。

[0063] [1.6.2.2][1.6.2.1]所述的组合物,其中抗体变体的含量为29.1面积%或更小、21.6面积%或更小、或13.8面积%或更小,并且其中所述组合物包含奈莫利珠单抗。

[0064] [2.1.1.1]奈莫利珠单抗的抗体变体,其分子量比由两条重链和两条轻链组成的奈莫利珠单抗小。

[0065] [2.1.1.2]奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由奈莫利珠单抗的两条重链形成的结构,所述重链通过重链中EU编号位置224处的半胱氨酸相互连接。

[0066] [2.1.1.3]奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由奈莫利珠单抗的两条轻链形成的

结构,所述轻链通过轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸相互连接。

[0067] [2.1.1.4] 奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由奈莫利珠单抗的一条轻链和一条重链形成的结构,其中轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸与重链中EU编号位置224处的半胱氨酸连接,并且重链中EU编号位置227和230处的半胱氨酸在单个重链内连接。

[0068] [2.1.1.5] 奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由一条轻链形成的结构,其中奈莫利珠单抗轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸与游离半胱氨酸连接。

[0069] [2.1.1.6] 奈莫利珠单抗的抗体变体,其具有由奈莫利珠单抗的两条重链和一条轻链形成的结构,其中两条重链通过两个位置的半胱氨酸相互连接:EU编号位置227和230;第一重链中EU编号位置224处的半胱氨酸与轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸连接,第二重链中EU编号位置224处的半胱氨酸与游离半胱氨酸连接。

[0070] [2.1.2] 药物组合物,其包含[2.1.1.1]-[2.1.1.6]中任一项的抗体变体,其中抗体变体在药物组合物中的总抗体分子中的比例为11.0CPA%或更低。

[0071] [2.2.1] 奈莫利珠单抗的抗体变体,其中奈莫利珠单抗重链中Kabat编号位置55处的天冬酰胺是脱酰胺的。

[0072] [2.2.2] 包含[2.2.1]所述抗体变体的药物组合物,其中酶消化药物组合物后源自抗体变体的含脱酰胺肽与含脱酰胺肽和相应未修饰肽之和的比率为2.0%或更低。

[0073] 本发明的效果

[0074] 本发明人成功鉴定出生物学活性明显低于奈莫利珠单抗的产品变体(抗体变体)。这种抗体变体可用作标准物质(标准品),用于检测/分析含有奈莫利珠单抗的药物组合物的质量评估中的变体。

[0075] 本发明人还发现了控制(减少)此类抗体变体(即天冬氨酸异构化变体)产生的方法,以及测量此类变体含量的方法(变体检测/分析方法)。这些方法比传统方法提供更高的通量,并且是奈莫利珠单抗的质量改进和质量管理的核心技术。此外,具有低含量此类抗体变体的本发明的含有奈莫利珠单抗的药物组合物可用作治疗和/或预防特应性皮炎、透析瘙痒症和其他瘙痒症的手段。

附图说明

[0076] 图1A是在实施例1所述条件下通过阴离子交换高效液相色谱分离含有奈莫利珠单抗的溶液的结果的色谱图。使用TSK DEAE NPR(内径:4.6mm,长度:35mm,粒径2.5 μ m)作为柱,并在表1所示的盐浓度调节条件1下进行分离。

[0077] 图1B是在实施例1所述条件下通过阴离子交换高效液相色谱分离含有奈莫利珠单抗的溶液的结果的色谱图。使用TSK DEAE NPR(内径:7.5mm,长度:75mm,粒径2.5 μ m)作为柱,并在表2所示的盐浓度调节条件2下进行分离。

[0078] 图2是显示HH二聚体和LL二聚体结构的示意图,这两种二聚体是奈莫利珠单抗的变体。

[0079] 图3是一组散点图,X轴表示在23 $^{\circ}$ C下保持不同时间段的HCCF或亲和池样品中包含的isoAsp形式(上)或Asu形式(下)的肽基含量,Y轴表示AE-HPLC的前区域1(上)或前区域2(下)的面积比。

[0080] 图4是显示HL形式(奈莫利珠单抗的变体)结构的示意图。

[0081] 图5是一组示意图,其显示了半胱氨酸化HHL形式(左)和半胱氨酸化轻链(右)的结构,它们都是奈莫利珠单抗的变体。

具体实施方式

[0082] 本发明的一个实施方案涉及具有降低的生物学活性(例如,通过结合IL-31受体抑制IL-31信号传导的活性)的抗体变体。在本发明人对奈莫利珠单抗的原料药的分析中,这些抗体变体被鉴定为天冬氨酸异构化变体(其中奈莫利珠单抗中的至少一个天冬氨酸残基已被改变为琥珀酰亚胺残基(Asu形式)或改变为异天冬氨酸残基(isoAsp形式)。在此,“抗体变体”也可以被称为原始抗体的产物变体,或异构化形式,异构化变体或异构体。

[0083] 奈莫利珠单抗是人源化IgG2抗体,其通过与IL-31受体结合而显示出对IL-31信号传导的抑制活性,并且由识别IL-31受体的重链和轻链组成。具体地,奈莫利珠单抗包含H链可变区和L链可变区,所述H链可变区包含SEQ ID NO:1所示的CDR1、SEQ ID NO:2所示的CDR2和SEQ ID NO:3所示的CDR3,所述L链可变区包含SEQ ID NO:4所示的CDR1、SEQ ID NO:5所示的CDR2和SEQ ID NO:6所示的CDR3;更具体地,奈莫利珠单抗包含SEQ ID NO:7所示的H链可变区和SEQ ID NO:8所示的L链可变区。更具体地,奈莫利珠单抗包含SEQ ID NO:9所示的H链和SEQ ID NO:10所示的L链。在此,奈莫利珠单抗与其变体分开提及,因此术语“奈莫利珠单抗”不应包括奈莫利珠单抗的变体(例如天冬氨酸异构化变体)。

[0084] 用于定义CDR的已知方法包括根据Kabat等人的方法(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版(1991) Bethesda,MD),根据Chothia等人的方法(Science (1986) 233,755-758)以及基于抗原-抗体接触区的方法(J Mol Biol(1996) 262,732-745)。具体地,每种方法都将CDR定义如下:

	CDR	Kabat	Chothia	Contact
	L1	L24-L34	L24-L34	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
[0085]	L3	L89-L97	L89-L97	L89-L96
	H1	H31-H35B	H26-H32/34	H30-H35B (Kabat 编码)
	H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编码)
	H2	H50-H65	H52-H56	H47-H58
[0086]	H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0087] 在本发明中,“抗体变体的生物学活性降低”意味着生物学活性低于用作比较参考的抗体(例如奈莫利珠单抗)的生物学活性,优选在统计学上显著低于该生物学活性。在一个实施方案中,本发明抗体变体的生物学活性比作为比较参考的抗体(例如奈莫利珠单抗)的生物学活性低10%或更低,例如,15%或更低,20%或更低,25%或更低,30%或更低,35%或更低,40%或更低,45%或更低,50%或更低,55%或更低,59%或更低,60%或更低,65%或更低,70%或更低,75%或更低,79%或更低,80%或更低,85%或更低,或90%或更低。在一个实施方案中,本发明抗体变体相对于用作比较参考的抗体(例如,CIM331标准物质,即奈莫利珠单抗)的生物学活性(相对生物学活性)为90%或更低,例如,85%或更低,

80%或更低,75%或更低,70%或更低,65%或更低,60%或更低,55%或更低,50%或更低,45%或更低,41%或更低,40%或更低,35%或更低,30%或更低,25%或更低,21%或更低,20%或更低,15%或更低,10%或更低,或者5%或更低。

[0088] 在一个实施方案中,奈莫利珠单抗或其抗体变体的生物学活性是针对IL-31受体的中和活性。在一个实施方案中,针对IL-31受体的中和活性是抑制IL-31和IL-31受体之间结合的活性。在一个实施方案中,针对IL-31受体的中和活性是通过与IL-31受体结合而对IL-31信号传导的抑制活性(例如,抑制IL-31依赖性细胞增殖的活性)。如W02010/064697所述,奈莫利珠单抗(CIM331)对人IL-31RA和食蟹猴IL-31RA具有中和活性。例如,可以使用W02010/064697中描述的方法评估这种中和活性。

[0089] 在一种方法中,可以通过检查奈莫利珠单抗或其抗体变体是否抑制IL-31与IL-31受体的结合来验证奈莫利珠单抗或其抗体变体是否抑制IL-31信号传导。用于进行这种测定的方法的实例包括使用ELISA或流式细胞术的测定和使用表面等离子体共振的测定。例如,使用ELISA,可以通过将IL-31受体(或IL-31RA)蛋白固定在平板上,制备用于检测通过使用二抗(例如酶标记的抗IL-31抗体)与其结合的IL-31蛋白量的系统,并测定添加奈莫利珠单抗或其抗体变体是否减少检测到的IL-31蛋白的量,来评估奈莫利珠单抗或其抗体变体是否抑制IL-31与IL-31受体的结合。

[0090] 在另一种方法中,可以通过检查奈莫利珠单抗或其抗体变体是否抑制由IL-31作用于细胞所诱导的生物学活性来验证奈莫利珠单抗或其抗体变体是否抑制IL-31信号传导。只要可以使用任何方法定量或定性地确定生物学活性,生物学活性就不受特别限制,并且这种生物学活性的实例包括细胞增殖活性、蛋白质磷酸化活性和基因/蛋白质表达诱导活性。例如,奈莫利珠单抗或其抗体变体是否抑制IL-31信号传导可以通过制备在表面表达IL-31受体的细胞来评估,并且其增殖活性是响应于外部IL-31刺激而诱导的,并且确定是否添加奈莫利珠单抗或其抗体变体降低了IL-31诱导的细胞增殖活性。作为这样的细胞,可以使用固有表达IL-31受体的天然存在的细胞,或者可以使用人工合成以表达IL-31受体的重组细胞。重组细胞的合适实例包括表达IL-31受体的Ba/F3细胞。作为另一种选择,可以使用Dillon等人的文件中描述的方法(Nat Immunol (2004) 5752-760)。

[0091] 在本公开中,奈莫利珠单抗或其抗体变体对IL-31信号传导的抑制程度不受限制,但可以是,例如,至少10%或更多,优选20%或更多,30%或更多,40%或更多,50%或更多,60%或更多,70%或更多,80%或更多,90%或更多,95%或更多,或98%或更多。

[0092] 术语“抗体”以最广泛的意义使用,包括单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(如双特异性抗体)、抗体衍生物和修饰抗体(Miller K等人,J Immunol. 2003, 170(9), 4854-61),只要它们显示出所需的生物学活性(例如,与抗原的结合活性)。抗体可以是小鼠抗体、人抗体、人源化抗体和嵌合抗体,或者可以是源自另一物种的抗体或人工合成的抗体。本文公开的抗体可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。免疫球蛋白可以源自任何物种(例如,人、小鼠或兔)。术语“抗体”、“免疫球蛋白(immune globulin)”和“免疫球蛋白(immunoglobulin)”在广义上可以互换使用。

[0093] 此外,抗体不仅可以是由两条重链和两条轻链组成的抗体分子,还可以是分子量较小的抗体片段。例如,本文中抗体的定义还包括具有由两条重链形成的结构、由两条轻链

形成的结构、由一条轻链和一条重链形成的结构、由一条与游离半胱氨酸连接的轻链形成的结构以及由两条重链和一条轻链形成的结构的分子。鉴于这个广泛的定义,本发明的抗体变体也包括在“抗体”中。因此,本文中“(所有) 药物组合物中的抗体分子”可包括抗体和其变体两者。

[0094] 利用基因工程技术产生的重组抗体可用作抗体。通过从杂交瘤或产生抗体的细胞(例如产生抗体的致敏淋巴细胞)克隆编码抗体的DNA;将其插入载体;然后将其引入宿主(宿主细胞)以产生抗体,可以获得重组抗体。

[0095] 在本发明中,抗体可以通过本领域技术人员已知的方法产生。具体地,将编码目标抗体的DNA插入表达载体中。插入到表达载体中,使得表达将在表达调节区(例如增强子和启动子)的控制下发生。接下来,使用该表达载体转化宿主细胞以表达抗体。在这种情况下,可以使用宿主和表达载体的适当的组合。

[0096] 由此获得的抗体可以从宿主细胞内部或细胞外部(培养基等)分离并纯化。抗体可以通过通常用于分离和纯化抗体的方法而分离和纯化,并且这些方法不受任何限制。例如,为了分离和纯化本发明中的抗体和抗体变体,可以通过适当选择和组合柱色谱、过滤、超滤、盐析、溶剂沉淀、溶剂萃取、蒸馏、免疫沉淀、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、透析、重结晶等来分离和纯化抗体。例如,在使用柱的分离和纯化中,可以使用各种类型的基质,包括阴离子交换基质、阳离子交换基质、抗人IgG亲和基质和蛋白质L基质。

[0097] 在不受特定理论约束的情况下,本发明的抗体变体可以是在抗体分子的制备过程(例如纯化步骤)中产生的抗体分子的产物变体,所述抗体分子(例如奈莫利珠单抗)具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区。在一个方面,本发明的抗体变体具有相对于具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体分子(例如奈莫利珠单抗)改变的至少一个(例如,一个、两个或三个)氨基酸残基。在一个实施方案中,本发明的抗体变体具有相对于具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体分子(例如,奈莫利珠单抗)改变的一个或多个、三个或更少的氨基酸残基,具体地,一个、两个或三个氨基酸残基。在特定实施方案中,本发明的抗体变体具有相对于具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区域的抗体分子(例如,奈莫利珠单抗)在氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)中改变的至少一个(例如,一个、两个或三个)氨基酸残基。在特定实施方案中,本发明的抗体变体具有相对于具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体分子(例如奈莫利珠单抗)在氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)中改变的一个或多个、三个或更少的氨基酸残基,具体地,一个、两个或三个氨基酸残基。

[0098] 在另一方面,相对于具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体分子(例如奈莫利珠单抗),本发明的抗体变体具有不同的SS键组合(半胱氨酸残基之间的键或半胱氨酸残基与游离半胱氨酸之间的键)。在该方面的一个实施方案中,相对于具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体分子(例如奈莫利珠单抗),本发明的抗体变体具有相同的氨基酸序列但不同的SS键(半胱氨酸残基之间的键或半胱氨酸残基与游离半胱氨酸之间的键)的组合,和不同的分子量。在另一个实施方案中,相对于具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO:3)的可变区的抗体分子(例如奈莫利珠单抗),本发明的抗体变体具有不同的氨基酸序列、不同的SS键(半胱氨酸残基之间的键

或半胱氨酸残基与游离半胱氨酸之间的键)的组合,和不同的分子量。

[0099] 在一个方面,本发明涉及具有以下特征的抗体变体:

[0100] -具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET(SEQ ID NO:3)的可变区的抗体(例如奈莫利珠单抗)的重链CDR中的一个或多个天冬氨酸(Asp)残基被改变为琥珀酰亚胺(Asu)残基或异天冬氨酸(isoAsp)残基;

[0101] -与上述抗体(例如奈莫利珠单抗)相比,生物学活性(通过与IL-31受体结合抑制IL-31信号传导的活性)极低。

[0102] -在通过亲和色谱纯化上述抗体(例如奈莫利珠单抗)之后和下一步之前,产生的量以依赖于含有抗体的溶液的存放时间的方式增加。

[0103] 具有这些特征的抗体变体在本文中可称为天冬氨酸异构化变体或天冬氨酸异构化形式。在特定实施方案中,上述抗体是奈莫利珠单抗,并且上述氨基酸序列是奈莫利珠单抗的重链CDR3的序列。

[0104] 在一个实施方案中,本发明的天冬氨酸异构化变体是具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET(SEQ ID NO:3)的可变区的抗体的变体,其中:

[0105] (a) 从上述序列N端起位置1处的氨基酸残基D(Asp),

[0106] 或

[0107] (b) 从上述序列N端起位置4处的氨基酸残基D(Asp),

[0108] 或

[0109] (c) 从上述序列N端起位置5处的氨基酸残基D(Asp)

[0110] 是琥珀酰亚胺残基(其在本文中可以称为琥珀酰亚胺形式或Asu形式)或异天冬氨酸残基(其在本文中可以称为异天冬氨酸形式或isoAsp形式)。琥珀酰亚胺形式的琥珀酰亚胺残基的位置优选为从上述序列(SEQ ID NO:3)的N端起的位置1或5,并且特别优选从上述序列的N端起的位置5。

[0111] 在特定实施方案中,本发明的天冬氨酸异构化变体是具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET(SEQ ID NO:3)的可变区的抗体的变体,其中:

[0112] (a2) 从上述序列N端起位置1和5处的氨基酸残基D(Asp),或

[0113] (b2) 从上述序列N端起位置4和5处的氨基酸残基D(Asp),或

[0114] (c2) 从上述序列N端起位置1和4处的氨基酸残基D(Asp),

[0115] 是琥珀酰亚胺(Asu)残基或异天冬氨酸(isoAsp)残基。此类抗体变体的实例包括抗体变体,其包括:

[0116] 从上述氨基酸序列(SEQ ID NO:3)的N端起

[0117] 位置1处的isoAsp残基和位置5处的Asu残基;

[0118] 位置1处的Asu残基和位置5处的isoAsp;

[0119] 位置1和5处的Asu残基;

[0120] 位置1和5处的isoAsp残基;

[0121] 位置4处的isoAsp残基和位置5处的Asu残基;

[0122] 位置4处的Asu残基和位置5处的isoAsp残基;

[0123] 位置4和5处的Asu残基;

[0124] 位置4和5处的isoAsp残基;

- [0125] 位置1处的isoAsp残基和位置4处的Asu残基;
- [0126] 位置1处的Asu残基和位置4处的isoAsp残基;
- [0127] 位置1和4处的Asu残基;或
- [0128] 位置1和4处的isoAsp残基,
- [0129] 优选包括抗体变体,其包括:
- [0130] 从上述氨基酸序列(SEQ ID NO:3)的N端起
- [0131] 位置1和4处的isoAsp残基;
- [0132] 位置1和5处的isoAsp残基;
- [0133] 位置4和5处的isoAsp残基;
- [0134] 位置1处的isoAsp残基和位置5处的Asu残基;或
- [0135] 位置4处的isoAsp残基和位置5处的Asu残基。
- [0136] 在特定实施方案中,上述抗体是奈莫利珠单抗,并且上述氨基酸序列是奈莫利珠单抗的重链CDR3的序列。
- [0137] 在另一方面,本发明还涉及用于检测天冬氨酸异构化变体的方法和用于分析天冬氨酸异构化变体的方法。在一个实施方案中,本发明的方法包括通过亲和色谱、离子交换色谱、正相色谱、反相色谱、亲水相互作用色谱(HILIC)、疏水相互作用色谱(HIC)、基于电荷的分离、尺寸排阻色谱(SEC)、凝胶渗透色谱(GPC)或其组合,分离包含具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET(SEQ ID NO:3)的可变区的抗体或经酶处理过的该抗体的样品。在特定实施方案中,本发明的方法包括在分离步骤之前对包含抗体的样品进行酶处理的步骤。用于处理包含抗体的样品的酶包括不限于胰蛋白酶和Lys-C。在特定实施方案中,本发明的方法包括,在分离包含经酶处理过的该抗体的样品的步骤之后,通过质谱和/或紫外吸收光谱鉴定和/或定量肽的步骤。
- [0138] 在本发明的方法中,可以使用具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR中天冬氨酸中存在/不存在结构变化作为指标来进行检测和分析。例如,在LCMS分析中,可以使用由于结构变化而引起的分子量或保留时间的变化作为指标来检测这种结构变化。或者,结构的变化可以利用离子交换色谱的分离程度的差异来检测。例如,当使用阴离子交换色谱进行分离时,本发明的天冬氨酸异构化变体在比主要组分(即奈莫利珠单抗)的主峰更基础的区域(保留时间更短的区域)中分离。
- [0139] 在本发明方法的一个实施方案中,离子交换色谱为阴离子交换色谱。在一个实施方案中,阴离子交换色谱的特征在于使用内径为4.6-7.5mm、长度为35-150mm、粒径为2.5-10 μ m的柱,柱温为25-50 $^{\circ}$ C,并使用pH6.0-10.0的流动相进行洗脱。在具体实施方案中,阴离子交换色谱的特征在于使用内径为7.5mm、长度为75mm、粒径为2.5 μ m的柱,柱温为40 $^{\circ}$ C,并使用含有250mmol/L氯化钠的pH7.5流动相进行洗脱。
- [0140] 此外,在一个实施方案中,本发明的方法包括执行从由定量分析、定性分析和结构分析组成的组中选择一个或多个分析的步骤,使用以下作为标准品:
- [0141] (i) 本发明的天冬氨酸异构化变体,
- [0142] (ii) 含有通过酶消化变体获得的isoAsp或Asu残基的肽,或
- [0143] (iii) 含有DGYDDGPYTLET(SEQ ID NO:3)氨基酸序列的肽,其中从序列N端起的位置1、4和5处的一个、两个或三个天冬氨酸(Asp,D)残基已改变为琥珀酰亚胺(Asu)残基或异

天冬氨酸(isoAsp)残基。(iii)的肽的实例包括其中从SEQ ID NO:3的氨基酸序列的N端起的位置1、4和5中的一个已改变为Asu残基或isoAsp残基的肽。(iii)的肽的其它实例包括其中从SEQ ID NO:3的氨基酸序列的N端起的位置1、4和5中的两个已被改变为Asu残基或isoAsp残基的肽,并且其包括:

- [0144] 位置1处的isoAsp残基和位置5处的Asu残基;
- [0145] 位置1处的Asu残基和位置5处的isoAsp残基;
- [0146] 位置1和5处的Asu残基;
- [0147] 位置1和5处的isoAsp残基;
- [0148] 位置4处的isoAsp残基和位置5处的Asu残基;
- [0149] 位置4处的Asu残基和位置5处的isoAsp残基;
- [0150] 位置4和5处的Asu残基;
- [0151] 位置4和5处的isoAsp残基;
- [0152] 位置1处的isoAsp残基和位置4处的Asu残基;
- [0153] 位置1处的Asu残基和位置4处的isoAsp残基;
- [0154] 位置1和4处的Asu残基;或
- [0155] 位置1和4处的isoAsp残基;
- [0156] 和优选地包括肽,其包含:
- [0157] 位置1和4处的isoAsp残基;
- [0158] 位置1和5处的isoAsp残基;
- [0159] 位置4和5处的isoAsp残基;
- [0160] 位置1处的isoAsp残基和位置5处的Asu残基;或
- [0161] 位置4处的isoAsp残基和位置5处的Asu残基。

[0162] 在另一方面,本发明通过执行上述检测方法和分析方法中的一种或组合,使得能够生产和质量控制含有奈莫利珠单抗的药物组合物。因此,本发明涉及用于含有奈莫利珠单抗的药物组合物的质量控制的方法,其包括执行如上所述的检测方法和分析方法,或组合这些方法。本发明还涉及用于生产含有奈莫利珠单抗的药物组合物的方法,其包括执行一种或多种此类检测方法、分析方法和质量控制方法。

[0163] 在本发明的生产方法中,通过亲和色谱、离子交换色谱、亲水相互作用色谱(HILIC)、疏水相互作用色谱(HIC)、基于电荷的分离、尺寸排阻色谱(SEC)、凝胶渗透色谱(GPC)或其组合纯化含有奈莫利珠单抗的溶液,可生产具有低含量天冬氨酸异构化变体的奈莫利珠单抗的药物组合物。这种具有低含量天冬氨酸异构化变体的含有奈莫利珠单抗的药物组合物可用作治疗和/或预防奈莫利珠单抗发挥治疗和/或预防作用的疾病的手段,例如特应性皮炎、透析瘙痒症和其他瘙痒症。

[0164] 在一个实施方案中,本发明的生产方法包括培养已引入编码奈莫利珠单抗的基因的奈莫利珠单抗生产细胞(例如CHO细胞)。该培养步骤可在本领域技术人员已知的适合于培养奈莫利珠单抗产生细胞(例如CHO细胞)的条件下执行。例如,可使用市售基础培养基(用于动物细胞培养的基础培养基)。

[0165] 在一个实施方案中,本发明的生产方法包括离心和过滤奈莫利珠单抗生产细胞的培养液以获得含有奈莫利珠单抗的溶液(收获细胞培养液:HCCF)。从所获得的含有奈莫利

珠单抗的溶液中纯化奈莫利珠单抗可以通过常用的柱色谱方法的组合进行,例如亲和色谱、离子交换色谱和疏水色谱。在特定实施方案中,本发明的生产方法包括通过亲和色谱(例如,蛋白质A亲和色谱)纯化从奈莫利珠单抗产生细胞获得的含有奈莫利珠单抗的溶液。含有抗体的溶液在亲和色谱纯化后和在下一步骤前的存放时间没有特别限制,但缩短此时间可降低天冬氨酸异构化变体的含量。因此,为了将通过本发明的生产方法获得的含有奈莫利珠单抗的药物组合物中的抗体和抗体变体的生物学活性维持在可接受水平,优选在亲和色谱纯化后和下一步骤前的含有抗体的溶液的存放时间在规定范围内(例如,在约138小时内、在约72小时内、在约48小时内或在约24小时内)。

[0166] 在另一方面中,本发明涉及包含具有包含氨基酸序列DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO: 3)的可变区的抗体(例如,奈莫利珠单抗)和其变体(例如,天冬氨酸异构化变体)的药物组合物,其中药物组合物中变体与所有抗体分子(包括前述抗体及其变体)的比率降低。其中变体比率降低的本发明的此类药物组合物可适当地用于治疗 and/或预防特应性皮炎、透析瘙痒症和其他瘙痒症。在一个实施方案中,本发明的药物组合物是用于治疗 and/或预防特应性皮炎、透析瘙痒症和其他瘙痒症中至少一种的药物组合物。本发明还涉及治疗或预防特应性皮炎、透析瘙痒症和其他瘙痒症中至少一种的方法,其包括施用本发明的药物组合物。

[0167] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物通过包括通过亲和色谱(例如,蛋白A亲和色谱)纯化的纯化步骤获得。如上所述,例如,通过将含有上述抗体(例如奈莫利珠单抗)的抗体溶液通过蛋白A亲和色谱纯化后和下一步之前的含有抗体的溶液的存放时间(例如,在18至28°C或18至23°C的存放时间,或优选在室温、18°C或23°C的存放时间)设置为短时间,可以降低所得组合物中天冬氨酸异构化变体与所有抗体分子的比率。

[0168] 本发明药物组合物中抗体分子中天冬氨酸异构化变体的比率可以通过各种方法进行评估,包括用于检测/分析天冬氨酸异构化变体的上述方法。用于分析诸如抗体之类的蛋白质的已知方法包括例如肽图分析(peptide mapping)方法,其中蛋白质通过酶消化等降解为肽片段,并且通过各种色谱技术将其分离并进行质谱和紫外吸收光谱以获得蛋白质的氨基酸序列和翻译后修饰信息。如本文实施例所述,本发明的天冬氨酸异构化变体的结构和含量可以通过肽图分析方法进行分析。

[0169] 在一个实施方案中,本发明药物组合物中抗体分子中天冬氨酸异构化变体的比率可以通过源自通过酶消化本发明药物组合物获得的天冬氨酸异构化变体的含有琥珀酰亚胺残基的肽和含有异天冬氨酸残基的肽与这些源自变体的肽和相应的未修饰的肽(未修饰的肽具有与源自变体的肽相同的氨基酸序列,除了修饰为琥珀酰亚胺或异天冬氨酸残基的位点是天冬氨酸残基)的总和的比率(这在本文中可称为肽基础上的天冬氨酸异构化变体的比率)来表示。可使用的消化酶包括例如胰蛋白酶和Lys-C。本发明药物组合物中肽基础上计算的异天冬氨酸(isoAsu形式)形式的比率(与肽基础上的天冬氨酸形式相比的比率)例如为25%或更低、20%或更低、15%或更低或9.4%或更低。本发明药物组合物中肽基础上的琥珀酰亚胺形式(Asu形式)的比率(与肽基础上的天冬氨酸形式相比的比率)例如为25%或更低、20%或更低、15%或更低或9.8%或更低。

[0170] 如本文实施例6所述,源自酶消化后得到的天冬氨酸异构化变体的含有琥珀酰亚胺残基的肽和含有异天冬氨酸残基的肽与源自这些变体的肽和相应的未修饰肽(具有与源自变体的肽相同氨基酸序列的未修饰肽,除了修饰为琥珀酰亚胺或异天冬氨酸残基的位点

是天冬氨酸残基)的总和的比率(肽基础上的天冬氨酸异构化变体的比率)与阴离子交换色谱(AE-HPLC)中天冬氨酸异构化变体洗脱峰的峰面积与总峰面积(峰面积比)的比率相关(图3)。因此,本发明药物组合中抗体分子中天冬氨酸异构化变体的比率,可以通过本发明药物组合物的阴离子交换色谱(AE-HPLC)分析中琥珀酰亚胺形式(Asu形式)和异天冬氨酸形式(isoAsp形式)一起的所有洗脱峰的峰面积与总峰面积的比率(峰面积比)来表示。该评价方法比基于肽图分析的检测/分析提供更高的通量,在奈莫利珠单抗的质量控制方面具有优势。

[0171] 在一个实施方案中,本发明药物组合物的阴离子交换色谱(AE-HPLC)分析中异天冬氨酸形式(isoAsu形式)和琥珀酰亚胺形式(Asu形式)的洗脱级分位于比包括奈莫利珠单抗(即本发明药物组合物的主要成分)的主峰更基础的区域(保留时间更短的区域)中,此处可称为前区域。在包含该区域(前区域)中包括的八个峰的区域中,包含与包括奈莫利珠单抗的主峰相邻的三个峰的区域(在此可称为前区域1)是异天冬氨酸形式(isoAsp形式)主要洗脱的区域,而包含其他五个峰的区域(在此可称为前区域2)是琥珀酰亚胺形式(Asu形式)主要洗脱的区域。因此,当使用阴离子交换色谱(AE-HPLC)通过本发明的分析方法进行评估时,本发明药物组合中异天冬氨酸形式(isoAsp形式)和琥珀酰亚胺形式(Asu形式)与所有抗体分子的比率可以分别由前区域1和前区域2的峰面积比来表示。

[0172] 在一个实施方案中,当使用阴离子交换色谱(AE-HPLC)通过本发明的分析方法进行评估时,本发明药物组合中异天冬氨酸形式(isoAsp形式)与所有抗体分子的比率(前区域1的面积比)为例如50.2面积%或更小、40.3面积%或更小、30.4面积%或更小、或者19.3面积%或更小。在一个实施方案中,当使用阴离子交换色谱(AE-HPLC)通过本发明的分析方法进行评估时,本发明药物组合中琥珀酰亚胺形式(Asu形式)与所有抗体分子的比率(前区域2的面积比)为例如36.6面积%或更小、29.1面积%或更小、21.6面积%或更小、或者13.8面积%或更小。

[0173] 此外,从肽基础上的天冬氨酸异构化变体的比率,可以基于如本文实施例6中所述的二项式分布来计算抗体基础上的天冬氨酸异构化变体的理论最大比率。

[0174] 基于天冬氨酸异构化变体的肽基础上的比率的计算,本发明药物组合中抗体分子中异天冬氨酸形式(isoAsp形式)与isoAsp形式和未修饰抗体之和的比率(抗体基础上的比率)为例如43.8%或更低、36.0%或更低、27.8%或更低、或17.9%或更低。此外,在本发明的药物组合中,其中两条重链含有isoAsp残基的抗体分子中isoAsp形式的抗体基础上的比率为例如6.3%或更低,4.0%或更低,2.3%或更低,或0.9%或更低。在本发明的药物组合中,其中两条重链之一含有isoAsp残基的抗体分子中isoAsp形式的抗体基础上的比率为例如37.5%或更低,32.0%或更低,25.5%或更低,或17.0%或更低。

[0175] 类似地,本发明药物组合中抗体分子中琥珀酰亚胺形式(Asu形式)与Asu形式和未修饰抗体之和的比率(抗体基础上的比率)为例如43.8%或更低、36.0%或更低、27.8%或更低、或者18.7%或更低。此外,本发明药物组合中抗体分子中两条重链含有isoAsp残基的Asu形式与Asu形式和未修饰抗体之和的比率为例如6.3%或更低、4.0%或更低、2.3%或更低、或者1.0%或更低。在本发明的药物组合中抗体分子中两条重链之一含有isoAsp残基的Asu形式与Asu形式和未修饰抗体之和的比率为例如37.5%或更低、32.0%或更低、25.5%或更低、或者17.7%或更低。

[0176] 在另一方面,本发明涉及用于生产其中天冬氨酸异构化变体的含量降低的药物组合物的方法,以及用于抑制天冬氨酸异构化变体的产生的方法。在通过亲和色谱(例如蛋白A亲和色谱)纯化含抗体的溶液之后和在下一步骤之前,将包含具有含有氨基酸序列 DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO: 3) 的可变区的抗体(例如奈莫利珠单抗)的含有抗体的溶液的存放时间设定为较短时间,可减少产生的天冬氨酸异构化变体的量。因此,上述方法包括通过亲和色谱(例如蛋白A亲和色谱)纯化从产生具有包含 DGYDDGPYTLET (SEQ ID NO: 3) 的氨基酸序列的可变区的抗体(例如奈莫利珠单抗)的细胞获得的含有抗体的组合物,其特征在于亲和色谱纯化后和下一步骤前,含有抗体的溶液的存放时间较短。在一个实施方案中,亲和色谱纯化后和下一步骤前含有抗体的溶液的存放时间(例如,在18-28°C或18-23°C下的存放时间,或优选在室温、18°C或23°C下的存放时间)为约138小时或更短,例如约72小时或更短、约48小时或更短、或约24小时或更短、优选约48小时或更短、更优选约24小时或更短。

[0177] 在另一方面,本发明涉及纯化含有抗体的组合物的方法,其包括通过亲和色谱(例如蛋白A亲和色谱)纯化含有抗体的组合物(例如,通过离心和过滤产生抗体的细胞的培养液获得的收获细胞培养液(HCCF))。在上述方法的一个实施方案中,所述抗体是具有包含 DGYDDGPYTLET 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3) 的可变区的抗体。在特定实施方案中,所述抗体是奈莫利珠单抗。在上述方法的一个实施方案中,在亲和色谱纯化后和下一步骤前的含有抗体的溶液的存放时间(例如,在18-28°C或18-23°C下的存放时间,或优选在室温、18°C或23°C下的存放时间)为约138小时或更短,例如约72小时或更短、约48小时或更短、或约24小时或更短。优选约72小时或更短,更优选约48小时或更短,甚至更优选约24小时或更短。

[0178] 在另一方面,本发明涉及具有以下结构之一的抗体变体:

[0179] (1) 由奈莫利珠单抗的两条重链形成的结构,这两条重链通过重链中EU编号位置224处的半胱氨酸相互连接(HH二聚体);

[0180] (2) 由奈莫利珠单抗的两条轻链形成的结构,这两条轻链通过轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸相互连接(LL二聚体);

[0181] (3) 由奈莫利珠单抗的一条轻链和一条重链形成的结构,其中轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸与重链中EU编号位置224处的半胱氨酸连接,重链中EU编号位置227和230处的半胱氨酸在单个重链内连接(HL形式);

[0182] (4) 由一条轻链形成的结构,其中奈莫利珠单抗的轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸与游离半胱氨酸连接(半胱氨酰化轻链);或

[0183] (5) 由奈莫利珠单抗的两条重链和一条轻链形成的结构,其中两条重链通过两个位置的半胱氨酸相互连接:EU编号位置227和230;第一重链中EU编号位置224处的半胱氨酸与轻链中EU编号位置214处的半胱氨酸连接,第二重链中EU编号位置224处的半胱氨酸与游离半胱氨酸连接(半胱氨酰化HHL形式)。

[0184] 具有这些结构的抗体变体是低分子量变体(LMW:低分子量种类),其分子量低于由两条重链和两条轻链组成的奈莫利珠单抗。此类变体在此可称为奈莫利珠单抗的低分子量变体。在另一方面中,本发明涉及包含奈莫利珠单抗及其低分子量变体(LMW)的药物组合物,其中药物组合物中低分子量变体与所有抗体分子的比率降低(例如,比率为11.0CPA(校正峰面积)%或更小)。

[0185] 在另一方面中,本发明涉及奈莫利珠单抗的抗体变体(其中重链中Kabat编号位置

55处的天冬酰胺是脱酰胺的)和包含这种抗体变体的药物组合物。在一个实施方案中,酶消化药物组合物后源自抗体变体的含有脱酰胺的肽与含有脱酰胺的肽和相应未修饰肽之和的比率为2.0%或更低。

[0186] 如本文所使用的,由表述“包含”涉及的方面包括由表述“基本上由……组成”涉及的方面以及由表述“由……组成”涉及的方面。

[0187] 本文所述的数值可以在一定范围内变化,例如,取决于本领域技术人员使用的仪器或设备、测量条件和程序,并且只要它们在允许实现本发明的目的的范围内,它们可以包括例如约10%的偏差。

[0188] 本文明确引用的所有专利和参考文献通过引用全部并入本说明书。

[0189] 将通过下面的实施例进一步说明本发明,但不应将其解释为仅限于此。

[0190] 实施例

[0191] [实施例1]通过阴离子交换高效液相色谱(HPLC)分离含有奈莫利珠单抗的溶液

[0192] [1.1]含有奈莫利珠单抗的溶液的制备

[0193] 奈莫利珠单抗,W02010/064697中描述的抗人IL-31RA抗体(也称为CIM331;H链,SEQ ID NO:9;L链,SEQ ID NO:10),根据上述专利文件的描述,通过本领域技术人员已知的方法制备。简言之,通过以下方法制备含有奈莫利珠单抗的溶液(原料药),所述方法包括培养含有引入编码奈莫利珠单抗的基因的载体的宿主细胞,以及纯化通过培养步骤获得的含有奈莫利珠单抗的溶液。该原料药通过W02021/100794中描述的方法用于生产奈莫利珠单抗药物产品。

[0194] [1.2]通过阴离子交换高效液相色谱法分离含有奈莫利珠单抗的溶液

[0195] 将流动相A加入等量的含有奈莫利珠单抗的溶液中,得到0.5mg/mL奈莫利珠单抗(奈莫利珠单抗及其变体的总浓度),并将其用作样品溶液。流动相A为空白试验溶液。在以下条件下,采用阴离子交换高效液相色谱法对20 μ L(或10 μ L,当使用TSK DEAE NPR(内径:4.6mm,长度:35mm,粒径:2.5 μ m)和盐浓度梯度条件1时)的样品溶液和空白试验溶液进行分离试验:

[0196] [试验条件]

[0197] 检测器:紫外-可见吸收分光光度计(测量波长:280nm)

[0198] 柱:TSK DEAE NPR(内径:4.6mm,长度:35mm,粒径:2.5 μ m)、TSK DEAE NPR(内径:7.5mm,长度:75mm,粒径:2.5 μ m)或其等效物

[0199] 保护柱:TSK保护柱DEAE NPR(内径:4.6mm,长度:5mm,粒径:5.0 μ m)

[0200] 柱温:40°C左右恒温

[0201] 流动相A:25mmol/L Tris缓冲液,pH 7.5 $\pm$ 0.1

[0202] 流动相B:25mmol/L含250mmol/L氯化钠的Tris缓冲液,pH 7.5 $\pm$ 0.1

[0203] 流量:1.0mL/分钟

[0204] 流动相的输送:流动相A和B的混合比例随受控浓度梯度的改变而改变:

[0205] [表1]

[0206] 盐浓度梯度条件1

[0207]

时间(分钟)	0	5	45
流动相A(体积%)	60	60	0

流动相B(体积%)	40	40	100
-----------	----	----	-----

[0208] [表2]

[0209] 盐浓度梯度条件2

时间(分钟)	0	5	45	55	65
流动相A(体积%)	60	60	30	0	0
流动相B(体积%)	40	40	70	100	100

[0211] 当在上述浓度调节条件1下使用TSK DEAE NPR(内径:4.6mm,长度:35mm,粒径2.5 μ m)作为柱进行分离时,获得如图1A所示的色谱图。同时,当在上述浓度调节条件2下使用TSK DEAE NPR(内径:7.5mm,长度:75mm,粒径2.5 μ m)作为柱进行分离时,获得如图1B所示的色谱图。

[0212] 如图1A-B所示,保留时间(较短的保留时间)早于包含主峰的主区域的区域被指定为前区域(含有比主区域更低盐浓度洗脱的级分的区域),保留时间(较长的保留时间)晚于主区域的区域被指定为后区域(含有比主区域更高盐浓度洗脱的级分的区域)。此外,前区域中的峰按接近主区域的顺序(即按保留时间的降序)指定为峰b1至b8,后区域中的峰按接近主区域的顺序(即按保留时间的升序)指定为峰a1至a6。将前区域按保留时间的降序分为和指定为前区域1(包含峰b1至b3的区域)和前区域2(包含峰b4至b8的区域)。

[0213] 在图1A和1B之间的比较中,图1B显示了峰b1和主峰之间更好的分离。因此,在下面的分离试验中,使用图1B的条件(柱:TSK DEAE NPR(内径:7.5mm,长度:75mm,粒径2.5 μ m);盐浓度梯度条件:见表2)。

[0214] 下面的表3总结了图1B所示的前区域1、前区域2和后区域的每个峰中包含的奈莫利珠单抗变体的信息。表3中的生物学活性是实施例5中所述的评价结果。

[0215] [表3]

区域名称	峰名称	与 CIM331标准物质相比的相对生物学活性(%)	与主峰相比的相对生物学活性(%)	特征
前区域 2	b8	23 $\pm$ 18	21 $\pm$ 17	在 HC 中 Asu103
	b4+b5+b6+b7	89 $\pm$ 5	80 $\pm$ 4	在 HC 中 Asu103
前区域 1	b2+b3	73 $\pm$ 12	66 $\pm$ 11	在 HC、LMWS (HH 二聚体、LL 二聚体 (铰链二硫键错配结构)等) 中 Asu103
	b1	45 $\pm$ 7	41 $\pm$ 6	在 HC、LMWS 中 CDR (Asp99/102/103)中 isoAsp
后区域	a1	110 $\pm$ 6	100 $\pm$ 6	在 HC、HMWS (HHL-Cys, L-Cys 等) 中 Asn384处的脱酰胺作用
	a2+a3	110 $\pm$ 7	100 $\pm$ 6	LMWS (HL)等
	a4	90 $\pm$ 5	82 $\pm$ 5	结构变体
	a5	88 $\pm$ 6	79 $\pm$ 6	在 HC、HMWS 中 Asn55处的脱酰胺作用
	a6	94 $\pm$ 4	85 $\pm$ 4	在 HC、HMWS 中 Asn55处的脱酰胺作用

[0217] HC:重链;LMW:低分子量种类;HMW:高分子量种类

[0218] [实施例2]前区域2中天冬氨酸异构化变体(isoAsp形式和琥珀酰亚胺形式)的评价

[0219] 使用实施例1中描述的柱和流动相分离并获得的含有每个峰的级分用含有氯化胍的pH 5.5变性剂溶液稀释,然后用三(2-羧乙基)膦还原。用含有2-吗啉乙磺酸和尿素的消

化缓冲液 (pH 5.5) 更换缓冲液后,使用胰蛋白酶进行消化反应。

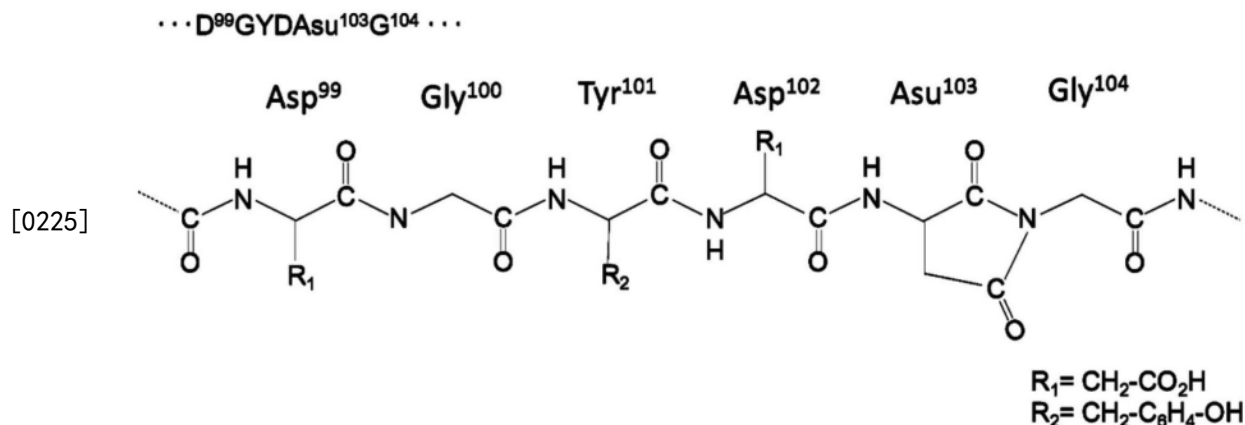
[0220] 将甲酸加入到所得的消化反应溶液中。将其注入反相高效液相色谱中进行分离,并使用质谱仪进行肽的鉴定和肽基础上的修饰比率的计算。根据MS色谱图中的峰面积计算出肽基础上的目标修饰的比率,并将其确定为目标变体的比率。由于在MS色谱图上发现未修饰肽的峰与含isoAsp残基的肽的峰重叠,因此肽基础上的修饰比率通过以下公式计算:

[0221] 肽基础上的修饰比率 (%) = (目标修饰肽的峰面积^{*1}) / {(目标修饰肽的峰面积) + (对应目标修饰肽的未修饰肽的峰面积^{*2}) - (含异isoAsp残基的肽的峰面积)} x 100

[0222] (*¹:指含isoAsp残基的肽或源自天冬氨酸异构化变体的含琥珀酰亚胺残基的肽)

[0223] (*²:指未修饰的天然肽,除修饰肽中的修饰部分外,其氨基酸序列与修饰肽相同)

[0224] 分析结果表明,在所有AE-HPLC峰中,含琥珀酰亚胺残基的肽在含有峰b8 (其在前区域2的峰中)的级分中以最高水平被检测到。具体而言,在峰b8中,以54.0%的比率检测到Asp103 (Kabat编号位置99处的Asp残基)向琥珀酰亚胺残基 (Asu103)的改变(修饰)。另一方面,Asp99 (Kabat编号位置95处的Asp残基)与琥珀酰亚胺残基的修饰比率很低(2.7%)。未检测到Asp102 (Kabat编号位置98处的Asp残基)修饰为琥珀酰亚胺残基,以及Asp99、Asp102和Asp103修饰为isoAsp残基。



[0226] 因此,与用实施例1中所述的柱和流动相分离并获得的含有主要成分奈莫利珠单抗的主峰 (Asu99和Asu102:未检测到,Asu103:3.4%)相比,发现天冬氨酸异构化变体 (Asu形式)主要在前区域2中洗脱。

[0227] [实施例3]前区域1的天冬氨酸异构化变体 (isoAsp形式和琥珀酰亚胺形式)的评价

[0228] 类似于实施例2,使用实施例1中描述的柱和流动相分离并获得的含有每个峰的级分用含有氯化胍的pH 5.5变性剂溶液稀释,然后用三(2-羧乙基)膦还原。用含有2-吗啉乙磺酸和尿素的消化缓冲液 (pH 5.5) 更换缓冲液后,使用胰蛋白酶进行消化反应。

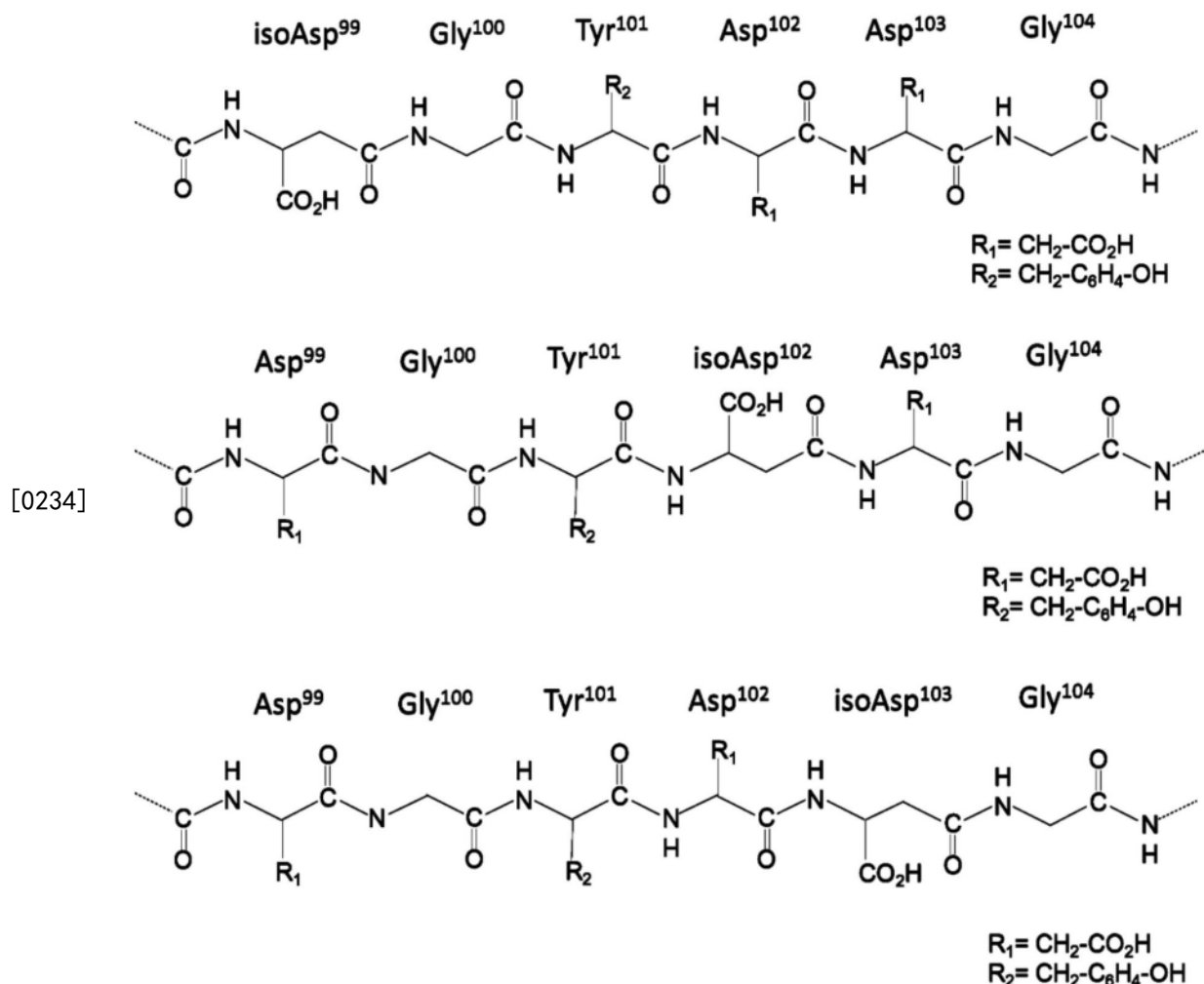
[0229] 将甲酸加入到所得的消化反应溶液中。将其注入反相高效液相色谱中进行分离,并使用质谱仪进行肽的鉴定和肽基础上的修饰比率的计算。根据MS色谱图中的峰面积计算出肽基础上的目标修饰的比率,并将其确定为目标变体的比率。由于在MS色谱图上发现未修饰肽的峰与含isoAsp残基的肽的峰重叠,因此肽基础上的修饰比率通过以下公式计算:

[0230] 肽基础上的修饰比率 (%) = (目标修饰肽的峰面积^{*1}) / {(目标修饰肽的峰面积) + (对应目标修饰肽的未修饰肽的峰面积^{*2}) - (含异isoAsp残基的肽的峰面积)} x 100

[0231] (*¹:指源自天冬氨酸异构化变体的含isoAsp残基的肽或含琥珀酰亚胺残基的肽)

[0232] (*²:指未修饰的天然肽,除修饰肽中的修饰部分外,其氨基酸序列与修饰肽相同)

[0233] 理论上可能的isoAsp形式是以下三种结构(顶部显示Asp99修饰为isoAsp残基,中间显示Asp102修饰为isoAsp残基,底部显示Asp103修饰为isoAsp残基)。但是,尚未鉴定这些Asp位点中的哪个/哪些实际上是异构化的。这是因为,尽管可以通过肽图分析串联质谱(MSMS分析)鉴定结构改变的氨基酸位点,但如果结构改变导致分子量改变,则isoAsp具有与Asp相同的分子量,使得上述使用MSMS的鉴定困难。



[0235] 分析结果表明,在所有AE-HPLC峰中,含isoAsp残基的肽在含有峰b8(其在前区域1的峰中)的级分中以最高水平(两种不同的含isoAsp残基的肽分别以11.6%和2.7%)被检测到。同时,在峰b1中,Asp99向琥珀酰亚胺残基(Asu99)的改变的比率为1.1%,Asp102向琥珀酰亚胺残基(Asu102)的改变的比率为0.2%,Asp103向琥珀酰亚胺残基(Asu103)改变的比率为4.7%。

[0236] 因此,发现与如实施例1所述用柱和流动相分离并获得的含有主要成分奈莫利珠单抗的主峰(Asp99、Asp102和Asp103中任何一个的isoAsp残基的修饰比率为0.5%)相比,天冬氨酸异构化变体(isoAsp形式)主要在前区域1中洗脱。

[0237] [实施例4]前区域1中低分子量种类(LMW)的评价

[0238] [4.1]使用非还原LC-ESI-MS进行评价

[0239] 用0.1%甲酸稀释使用实施例1中描述的柱和流动相分离并获得的含有每个峰的

级分,然后注入高效液相色谱,用脱盐柱脱盐,然后使用质谱仪进行LMWS鉴定。

[0240] 结果鉴定出前区域1的峰中的峰b2和b3含有HH二聚体和LL二聚体。

[0241] [4.2]非还原胰蛋白酶肽图分析评价

[0242] 用含有氯化胍的pH7.0变性剂溶液稀释使用实施例1中描述的柱和流动相分离并获得的含有每个峰的级分,用于变性处理。然后用碘乙酸为半胱氨酸侧链加帽,用含有Tris、尿素和EDTA的pH7.0消化缓冲液进行缓冲液更换,并与胰蛋白酶进行消化反应。将甲酸加入到所得的消化反应溶液中。将其注入反相高效液相色谱中进行分离,并使用质谱仪进行肽的鉴定。结果,鉴定出HH二聚体具有一种结构,其中通常与轻链C214形成二硫键的重链C224将两条重链相互连接。推测LL二聚体具有一种结构,其中通常与重链C224形成二硫键的轻链C214将两条轻链相互连接(图2)。

[0243] [4.3]非还原的CE-SDS评价

[0244] 使用实施例1中描述的柱和流动相分离并获得的含有每个峰的级分用0.1mol/L磷酸钠缓冲液进行缓冲液更换,然后与含有N-乙基马来酰亚胺的SDS溶液混合,并加热以变性和为半胱氨酸侧链加帽。接下来,将含有氰化钾和FQ染料的染料反应溶液加入到溶液中,并加热以用荧光染料标记。向所得溶液中加入SDS溶液,并通过毛细管电泳SDS进行分析。

[0245] 结果,在峰b2和b3中,HH二聚体和LL二聚体的含量分别为18.4CPA(校正峰面积)%和8.6CPA%。

[0246] [实施例5]天冬氨酸异构化变体(isoAsp形式和琥珀酰亚胺形式)的生物学活性评价

[0247] 通过测量抑制以IL-31依赖性方式增殖的BaF/hIL-31R细胞(表达人IL-31R的BaF细胞)的增殖的活性来评价每种变体的生物学活性。

[0248] 具体地,将含有IL-31的FBS/RPMI培养基添加到使用实施例1中描述的柱和流动相分离和获得的含有每个峰的级分中,以制备各种浓度的稀释液。将每种稀释液加入到96孔微孔板的每个孔中。在每个孔中加入BaF/hIL-31R细胞悬浮液后,将细胞在37°C的CO₂培养箱中培养24小时。接下来,加入过滤的alamarBlue,并将细胞在37°C的CO₂培养箱中进一步培养3小时。然后,使用酶标仪测量吸光度(OD₅₇₀-OD₆₀₀)。

[0249] 结果,当主峰用作基线时(当标准化为主峰为100%时),相对于主峰,峰b8的生物学活性为21%,这表明主要包含在峰b8(Asu103变体,占54.0%)中的琥珀酰亚胺形式的生物学活性显著降低。

[0250] 这还表明,相对于主峰,峰b1(isoAsp形式含量:11.6%)的生物学活性降低至41%。强烈地表明,这种isoAsp形式中的Asp异构化会影响生物学活性,因为它是CDR中的化学变化。(Harris RJ.Heterogeneity of recombinant antibodies:linking structure to function.Dev Biol(Basel)2005;122:117-27;Dick,LWJ,等人Identification and measurement of isoaspartic acid formation in the complementarity determining region of a fully human monoclonal antibody.J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2009;877:3841-9)

[0251] [实施例6]确认AE-HPLC用作天冬氨酸异构化变体(isoAsp形式和琥珀酰亚胺形式)的控制/分析方法

[0252] 在通过培养表达奈莫利珠单抗的宿主细胞获得的含有奈莫利珠单抗的溶液的纯

化过程中,为了检查以下情况后含有抗体溶液的存放时间的影响:

[0253] 生产培养(HCCF)后离心/过滤的收获步骤,和

[0254] 后续蛋白A亲和色谱纯化步骤(亲和池)

[0255] 并且在关于天冬氨酸异构化变体(isoAsp形式和琥珀酰亚胺形式)的含量的每个下一步骤(每个纯化步骤后的样品存放时间)之前,在不同样品(HCCF(23°C,存放0或72小时后)和亲和池(23°C,存放0、24、48、72或138小时后)中检查isoASP形式和琥珀酰亚胺形式的含量。如实施例2和3所示,通过使用胰蛋白酶消化每个样品并通过HPLC分离,然后使用MS强度进行定量MS分析,从而测定肽基础上的相对于未修饰形式的变体的含量。使用以下公式计算肽基础上的每个变体的含量:

[0256] 肽基础上的变体的含量(强度%) = (目标修饰肽^{*1}的MS强度^{*2}) / {(目标修饰肽的MS强度) + (对应于目标修饰肽的未修饰肽^{*3}的MS强度)} x100

[0257] (*¹:指源自天冬氨酸异构化变体的含isoAsp残基的肽或含琥珀酰亚胺残基的肽)

[0258] (*²:MS强度是来源于肽的MS强度。)

[0259] (*³:指未修饰的天然肽,除修饰肽中的修饰部分外,其氨基酸序列与修饰肽相同)

[0260] 结果表明,天冬氨酸异构化变体(isoAsp形式和琥珀酰亚胺形式)在亲和池中以时间依赖性方式显著增加(表4)。

[0261] 此外,如实施例1所示,通过AE-HPLC分离上述样品(HCCF(23°C,存放0或72小时后)和亲和池(23°C,存放0、24、48、72或138小时后)),并测定HPLC色谱图中每个区域的面积比。检查了通过这些分析获得的isoASP形式的肽基础含量与AE-HPLC中前区域1的面积比之间以及琥珀酰亚胺形式的肽基础含量与AE-HPLC中前区域2的面积比之间的相关性。结果,发现isoAsp形式含量与前区域1的面积比相关(图3)。此外,发现琥珀酰亚胺形式的含量与前区域2的面积比相关(图3),这表明AE-HPLC可作为这些变体含量的对照/分析方法。

[0262] 此外,在亲和池中,前区域2每小时的面积增加率为0.0552面积%/小时,前区域1的面积增加率为0.0448面积%/小时(表4)。鉴于高的每小时面积增加率,在亲和色谱纯化步骤和下一步骤之间适当设置样品存放时间对于奈莫利珠单抗的质量保证是重要的。

[0263] [表4]

[0264]

DS 分组	过程	存 放 时 间 (小时)	总 isoAsp(强 度%)	AE-HPLC 中 前区域 1 (面积%)	总 Asu (强度 %)	AE-HPLC 中 前区域 2 (面积%)
A	HCCF (23°C)	0	3.856	7.711	4.142	4.647
		72	4.150	7.849	4.755	4.412
	亲和池 (23°C)	0	4.001	8.401	4.537	5.335
		24	4.055	9.709	5.744	6.822
		48	4.569	11.083	5.917	8.351
		72	5.813	12.186	7.053	10.690
		138	6.787	15.340	9.270	13.665
B	HCCF (23°C)	0	3.492	7.851	4.249	5.130
		72	3.729	8.165	4.391	4.728

[0265]		亲和池 (23°C)	0	4.390	8.954	5.018	6.210
			24	4.643	10.092	5.189	7.564
			48	5.022	11.509	5.604	8.827
			72	5.695	12.189	7.625	9.844
			138	8.237	15.529	10.245	13.234
	C	HCCF (23°C)	0	3.839	7.746	4.454	5.231
			72	3.729	7.919	2.930	5.134
		亲和池 (23°C)	0	4.049	8.507	5.096	5.880
			24	4.481	9.823	5.146	7.316
			48	5.437	11.132	6.250	8.748
			72	5.982	11.949	6.179	9.632
			138	6.853	15.416	9.343	13.397

[0266] [实施例7]在原料药生产中抑制天冬氨酸异构化变体(isoAsp形式和琥珀酰亚胺形式)产生的方法

[0267] [7.1]前区域1

[0268] 根据对临床表现、生物学活性、PK、安全性和免疫原性的预测的影响,对于前区域1的AE-HPLC面积比,奈莫利珠单抗药物产品的保质期规格设定为19.3%或更低。isoAsp形式是抗体药物中常见的修饰形式,被认为对安全性和免疫原性影响较小。对于生物学活性,发现峰b1相对于CIM331标准物质(奈莫利珠单抗)具有低至45%的生物学活性(表3)。然而,预计前区域1的AE-HPLC面积比增加至19.3%不会对整个药物产品的生物学活性产生显著影响。

[0269] 接下来,从奈莫利珠单抗药物产品的长期稳定性测试中,估计了36个月储存期间前区域1的增加量。结果,得到的关于储存期(M)和前区域1的面积比(面积%)的斜率的95%置信区间的上限为0.154面积%/M。因此,估计36M的面积比增加了5.5面积%(0.154面积%/M×36M=5.544面积%)。因此,对于该面积比,原料药的释放规格设定为13.8面积%(19.3%-5.5%)或更小。此外,如上所述,亲和池中前区域1的每小时的面积增加率为0.0448面积%/小时(表4),这是纯化过程中面积增加率最高的;因此,事实证明,适当设置亲和池的存放时间对于质量保证很重要。从这些稳定性结果可以发现,为了确保适当的质量,亲和池(18°C-28°C)的存放时间优选在24小时内(增加范围为1.08面积%)。

[0270] 如上所示,基于用X轴上isoAsp形式的肽基础含量和Y轴上前区域1的AE-HPLC面积比绘制的数据,获得了回归线(图3)。获得的回归线用于计算对应于前区域1的面积比为19.3%的肽基础上的总isoAsp形式含量。该计算导致相对于isoAsp形式和相应的未经历修饰为isoAsp残基或Asu残基的未修饰肽(未修饰肽具有与isoAsp形式相同的氨基酸序列,除了修饰成isoAsp残基和Asu残基的位点是天冬氨酸)的总和的比率为9.4%。基于该肽基础的含量,使用以下基于二项分布的公式计算抗体基础上^{*1}的isoAsp形式的理论最大含量:

[0271] ^{*1}:对应于Asu形式为0%时。

[0272] 肽基础的含量:X(%)<9.4%>

[0273] 两条重链均异构化为isoASP残基的isoASP形式: $X^2 < (0.094)^2 \times 100 = 0.00883 \rightarrow 0.88\% >$

[0274] 两条重链均未修饰的天然形式: $(1-X)^2 < (1-0.094) \times (1-0.094) = 0.8208 \rightarrow 82.1\% >$

[0275] 其中任一重链异构化为isoASP残基的isoASP形式: $X(1-X) + (1-X)X = 2X(1-X) < 2x$

$0.094 \times (1 - 0.094) = 0.1703 \rightarrow 17.0\%$

[0276] 因此,发现肽基础上的总isoAsp形式含量为9.4% (前区域1的AE-HPLC面积比为19.3%) 相当于抗体基础上的总isoAsp形式含量为17.9%,这是两条重链含有isoAsp残基的isoAsp形式的最大含量的总和:0.88%,以及其中两条重链之一含有isoAsp残基的isoAsp形式的最大含量:17.0%。

[0277] [7.2]前区域2

[0278] 根据对临床表现、生物学活性、PK、安全性和免疫原性的预测的影响,对于前区域2的AE-HPLC面积比,奈莫利珠单抗药物产品的保质期规格设定为13.8%或更低。Asu形式是抗体药物中常见的修饰形式,被认为对安全性和免疫原性影响较小。对于生物学活性,发现峰b8相对于CIM331标准物质(奈莫利珠单抗)具有低至23%的生物学活性(表3)。然而,预计前区域2的AE-HPLC面积比增加至13.8%不会对整个药物产品的生物学活性产生显著影响。

[0279] 接下来,从奈莫利珠单抗药物产品的长期稳定性测试中,估计了36个月储存期间前区域2的增加量。结果,得到的关于储存期(M)和前区域2的面积比(面积%)的斜率的95%置信区间的上限为0.123面积%/M。因此,估计36M的面积比增加了4.4面积%($0.123 \text{ 面积} \% / \text{M} \times 36 \text{M} = 4.428 \text{ 面积} \%$)。因此,对于该面积比,原料药的释放规格设定为9.4面积%($13.8\% - 4.4\%$)或更小。此外,如上所述,亲和池中前区域2的每小时的面积增加率为0.0552面积%/小时(表4),这是纯化过程中面积增加率最高的;因此,事实证明,适当设置亲和池的存放时间对于质量保证很重要。从这些稳定性结果可以发现,为了确保适当的质量,亲和池(18°C-28°C)的存放时间优选在24小时内(增加范围为1.32面积%)。

[0280] 如上所示,基于用X轴上Asu形式的肽基础的含量和Y轴上前区域2的AE-HPLC面积比绘制的数据,获得了回归线(图3)。获得的回归线用于计算对应于前区域2的面积比为13.8%的肽基础上的总Asu形式含量。这导致相对于Asu形式和相应的未经历修饰为isoAsp残基或Asu残基的未修饰肽(未修饰肽具有与isoAsp形式相同的氨基酸序列,除了修饰成isoAsp残基和Asu残基的位点是天冬氨酸)的总和的比率为9.8%。基于该肽基础的含量,使用以下基于二项分布的公式计算抗体基础上^{*1}的Asu形式的理论最大含量:

[0281] ^{*1}:对应于isoAsp形式为0%时。

[0282] 肽基础的含量: $X(\%) < 9.8\%$

[0283] 两条重链均异构化为Asu残基的Asu形式: $X^2 < (0.098)^2 \times 100 = 0.00960 \rightarrow 0.96\%$

[0284] 两条重链均未修饰的天然形式: $(1 - X)^2 < (1 - 0.098) \times (1 - 0.098) = 0.8136 \rightarrow 81.4\%$

[0285] 其中任一重链异构化为Asu残基的Asu形式: $2X(1 - X) < 2 \times 0.098 \times (1 - 0.098) = 0.1767 \rightarrow 17.7\%$

[0286] 因此,发现肽基础上的总Asu形式含量为9.8% (前区域2的AE-HPLC面积比为13.8%) 相当于抗体基础上的总Asu形式含量为18.6%,这是两条重链含有Asu残基的Asu形式的最大含量的总和:0.96%,以及其中两条重链之一含有Asu残基的Asu形式的最大含量:17.7%。

[0287] [实施例8]后区域中CDR脱酰胺形式的评价

[0288] 使用实施例1中描述的柱和流动相分离并获得的含有每个峰的级分用含有氯化胍的变性剂溶液pH7.0稀释,然后用二硫苏糖醇还原。然后用碘乙酸为半胱氨酸侧链加帽,用

含有Tris、尿素和EDTA的pH7.0消化缓冲液进行缓冲液更换,并用胰蛋白酶进行消化反应。将甲酸加入到所得的消化反应溶液中。将其注入反相高效液相色谱中进行分离,并使用质谱仪进行肽的鉴定和变体的定量。

[0289] 结果,在所有AE-HPLC峰中,含有峰a6(其位于后区域的峰中)的级分在奈莫利珠单抗重链的CDR中Asn55处显示出14.9%的最高脱酰胺水平。由于该峰的脱酰胺水平较低,因此无法通过生物学活性测量直接评价Asn55处脱酰胺对生物学活性的影响。然而,由于CDR在抗原结合中起着至关重要的作用,因此强烈建议CDR中Asn55的脱酰胺会影响生物学活性。

[0290] Harris, R.J., 等人, Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. 752 (2): p. 233-45

[0291] Yan B, Steen S, Hambly D, 等人 Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain. J Pharm Sci 2009; 98: 3509-21.

[0292] Qi P, Volkin DB, Zhao H, 等人 Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form. J Pharm Sci 2009; 98: 3117-30

[0293] 此外,通过相同的方法对在40°C下储存12周的原料药进行分析表明,即使对于在40°C下储存12周的原料药,上述脱酰胺含量在肽基础上也为1.6%,并且还推测在30°C下储存药物产品期间含量不会显著增加(例如,肽基础上为1.6%)。

[0294] [实施例9]后区域中LMWS的评价

[0295] [9.1]使用非还原LC-ESI-MS进行评价

[0296] 用0.1%甲酸稀释使用实施例1中描述的柱和流动相分离并获得的含有每个峰的级分,然后注入高效液相色谱,用脱盐柱脱盐,然后使用质谱仪进行LMWS的鉴定。

[0297] 结果,鉴定出含有峰a2和a3(其位于后区域的峰中)的级分含有HL形式,和含有峰a1的级分含有半胱氨酰化的轻链和半胱氨酰化的HHL形式。

[0298] [9.2]使用非还原胰蛋白酶肽图分析进行评估

[0299] 用含有氯化胍的变性剂溶液pH7.0稀释使用实施例1中描述的柱和流动相分离并获得的含有每个峰的级分,用于变性处理。然后用碘乙酸为半胱氨酸侧链加帽,用含有Tris、尿素和EDTA的pH7.0消化缓冲液进行缓冲液更换,并用胰蛋白酶进行消化反应。将甲酸加入到所得的消化反应溶液中。将其注入反相高效液相色谱中进行分离,并使用质谱仪进行肽的鉴定。

[0300] 结果得出结论,峰a2和a3中包含的HL形式具有一个重链中的Cys227和Cys230形成二硫键的结构(图4)。

[0301] 同时,结果并未导致鉴定峰a1中包含的半胱氨酰化轻链和半胱氨酰化HHL形式中的半胱氨酰化位点,但推测它们具有图5所示的结构。

[0302] [9.3]使用非还原CE-SDS进行评估

[0303] 使用实施例1中描述的柱和流动相分离并获得的含有每个峰的级分用0.1mol/L磷酸钠缓冲液进行缓冲液更换,然后与含有N-乙基马来酰亚胺的SDS溶液混合,用于为半胱氨

酸侧链加帽。接下来,将含有氰化钾和FQ染料的染料反应溶液加入到溶液中,并用荧光染料进行标记。向所得溶液中加入SDS溶液,并通过毛细管电泳SDS进行分析。

[0304] 结果,确定含有峰a2和a3的级分中HL形式的含量为16.7CPA%,含有峰a1的级分中半胱氨酰化轻链的含量为14.5CPA%。

[0305] [实施例10]LMW的控制

[0306] [10.1]评估低分子量种类的方法(CE-SDS)

[0307] 将奈莫利珠单抗的原料药和药物产品分别用0.1mol/L磷酸钠缓冲液进行缓冲液更换,然后与含有N-乙基马来酰亚胺的SDS溶液混合以为半胱氨酸侧链加帽。接下来,将含有氰化钾和FQ染料的染料反应溶液加入到溶液中,并用荧光染料进行标记。将SDS溶液加入到所得溶液中,并使用毛细管电泳SDS(CE-SDS)进行分离。一组迁移时间短于奈莫利珠单抗的原料药和药物产品(奈莫利珠单抗)主要成分的峰被指定为一组分子量小于奈莫利珠单抗的峰。该峰组确定为LMWS控制/分析方法的评价对象。

[0308] [10.2]低分子量种类含量的控制(CE-SDS)

[0309] 根据对临床表现、生物学活性、PK、安全性和免疫原性的预测影响,通过CE-SDS(包括根据AE-HPLC在含有峰b2和b3的级分和含有峰a1、a2和a3的级分中鉴定出的LMWS)分析LMWS的含量,将奈莫利珠单抗药物产品的保质期规格设定为11.0CPA%或更低。由于在药物产品的稳定性测试中未发现LMWS含量增加,因此原料药和药物产品的释放规格也设定为11.0CPA%或更低。

[0310] 工业实用性

[0311] 本发明人发现了比奈莫利珠单抗具有更低生物学活性的抗体变体和其分析方法。本发明的抗体变体和分析方法可用于奈莫利珠单抗的原料药和药物产品的质量评估,也可用于开发具有降低的本发明抗体变体含量的奈莫利珠单抗药物产品,以及开发抑制本发明抗体变体的产生的方法。此外,具有本发明抗体变体含量降低的含有奈莫利珠单抗的药物组合物可作为治疗和/或预防特应性皮炎、透析瘙痒症和其他瘙痒症的手段。

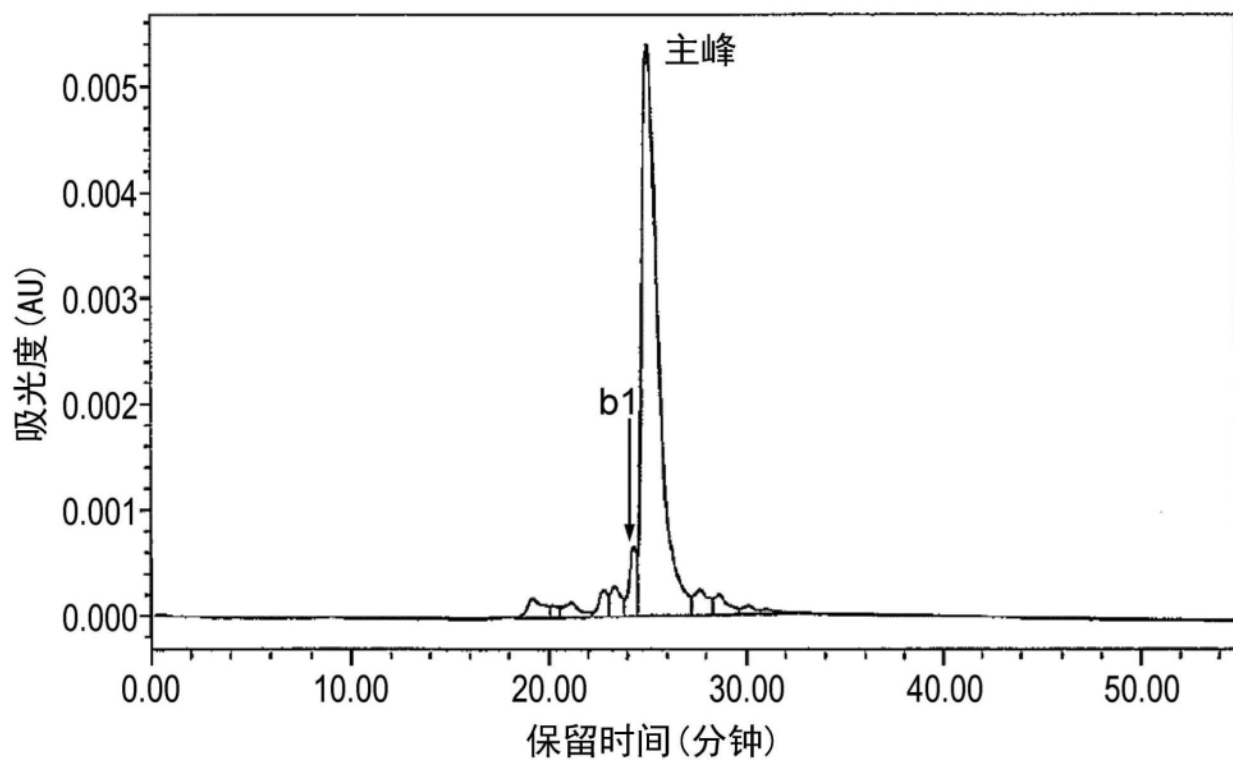


图1A

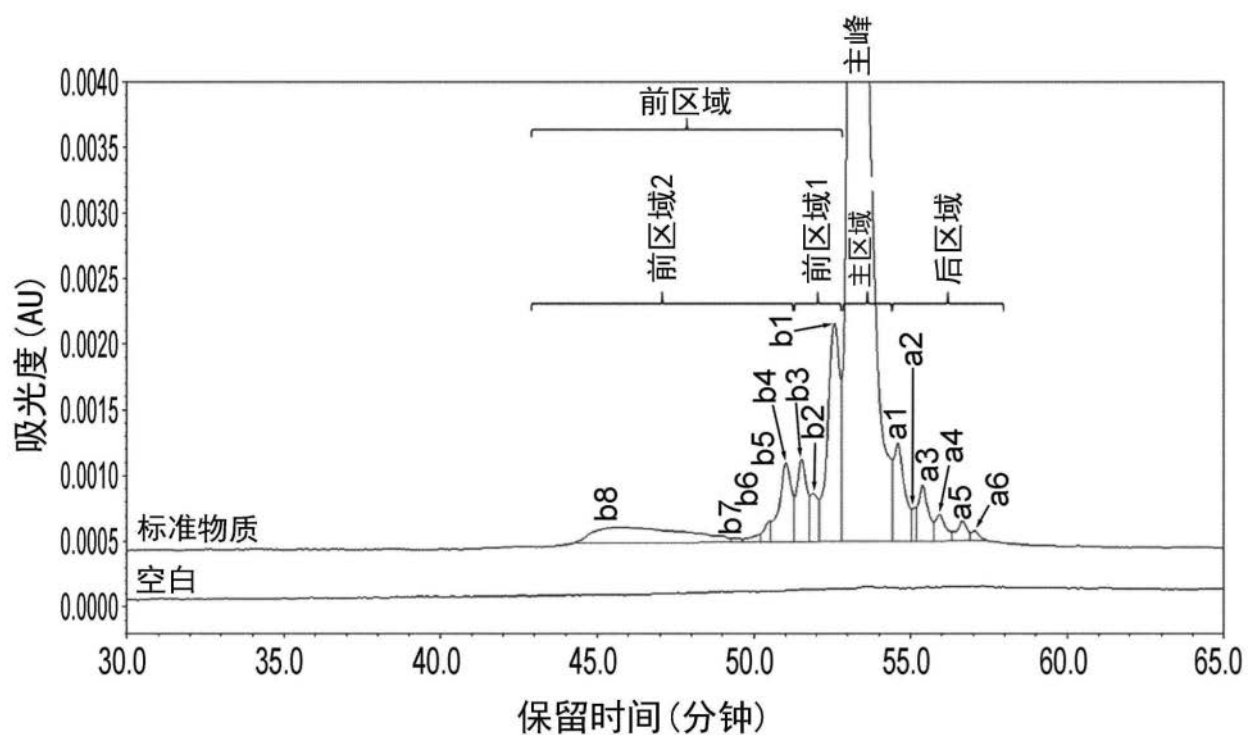


图1B

铰链二硫键错配

LMWS (LL 二聚体)

LMWS (HH 二聚体)

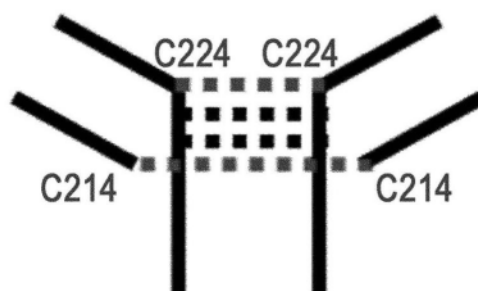


图2

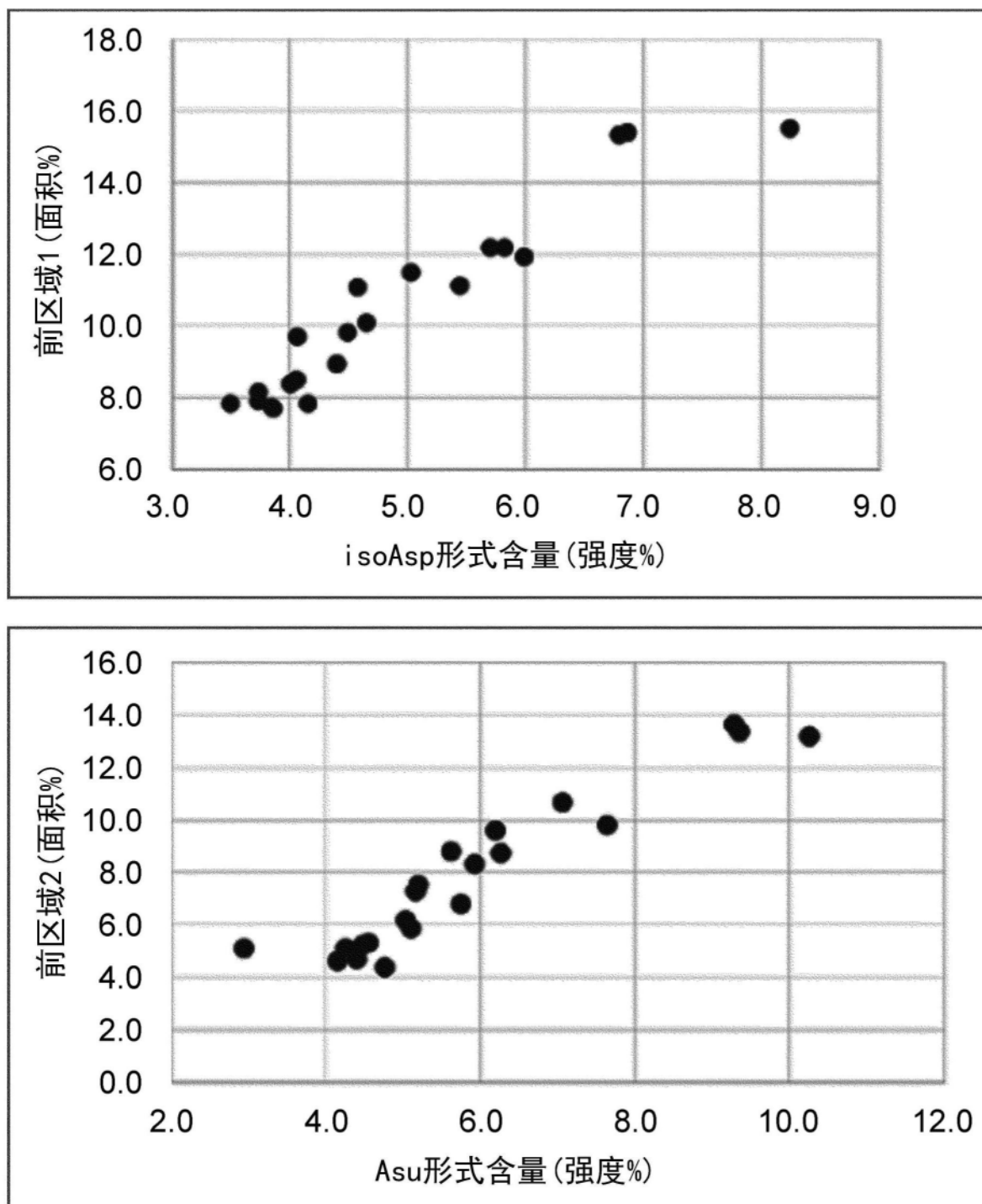


图3

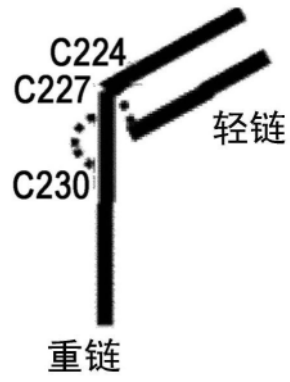


图4

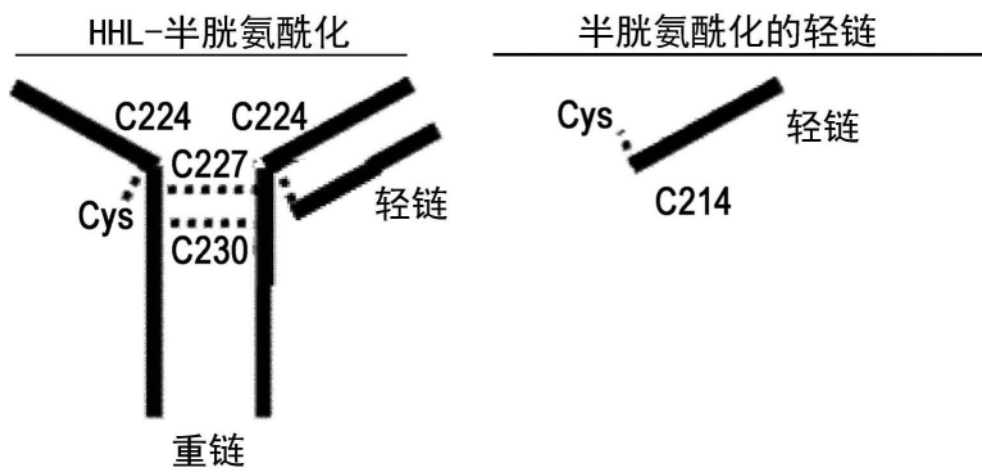


图5