

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580027483.3

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 22 日

[11] 公开号 CN 101022831A

[22] 申请日 2005.8.12

[21] 申请号 200580027483.3

[30] 优先权

[32] 2004.8.13 [33] US [31] 60/601,311

[86] 国际申请 PCT/US2005/028861 2005.8.12

[87] 国际公布 WO2006/020935 英 2006.2.23

[85] 进入国家阶段日期 2007.2.13

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 L·李 A·坎托尔

S·B·麦米兰

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 梁 谋

权利要求书 4 页 说明书 32 页 附图 33 页

[54] 发明名称

稳定制剂

[57] 摘要

描述了适于蛋白质，例如抗体以相对宽范围的蛋白质浓度、pH、和缓冲液类型储存的制剂。也描述了储存蛋白质的方法和鉴定用于储存特定蛋白质的合适制剂的方法。通常，制剂包含低至没有表面活性剂，没有至相对低的盐浓度，以及需要相对低的缓冲液浓度。

1. 一种制剂，包括
 - (a) 分离的蛋白质；和
 - (b) 具有 pH 4.0 至 pH 8.0 的含水溶液，其中该制剂不包含防冻剂或表面活性剂，并且该蛋白质在 -80°C 至 8°C 稳定至少 3 周。
2. 权利要求 1 的制剂，其中该制剂包括少于 150 mM 的盐。
3. 权利要求 1 的制剂，其中该蛋白质是抗体。
4. 权利要求 1 的制剂，其中该蛋白质是多克隆抗体。
5. 权利要求 1 的制剂，其中该蛋白质是单克隆抗体。
6. 权利要求 1 的制剂，其中该蛋白质是抗 - CD22、抗 - Lewis Y 抗体或抗 - 5T4 抗体。
7. 权利要求 1 的制剂，其中该蛋白质是重组蛋白质。
8. 权利要求 1 的制剂，其中该蛋白质是治疗性的蛋白质。
9. 权利要求 1 的制剂，其中该含水溶液是无菌水。
10. 权利要求 1 的制剂，其中该含水溶液进一步包括缓冲液。
11. 权利要求 10 的制剂，其中该缓冲液是乙酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、或柠檬酸盐缓冲液。
12. 权利要求 10 的制剂，其中该缓冲液浓度是约 0 mM 至 150 mM。
13. 权利要求 10 的制剂，其中该缓冲液浓度是约 50 mM 至 100 mM。
14. 权利要求 10 的制剂，其中该缓冲液浓度是约 1 mM 至 50 mM。
15. 权利要求 1 的制剂，其中该蛋白质在 5°C 稳定至少 1 年 或该蛋白质在 5°C 稳定至少 3 年。
16. 权利要求 1 的制剂，其中该蛋白质以约 1 mg/ml 至约 200 mg/ml，约 1 mg/ml 至约 100 mg/ml，约 20 mg/ml 至约 200 mg/ml，或约 20 mg/ml 至约 100 mg/ml 的浓度存在。
17. 权利要求 1 的制剂，其中该蛋白质以约 10 mg/ml 至约 30 mg/ml，25 mg/ml 至约 30 mg/ml，约 10 mg/ml 至约 50 mg/ml，或约 20 mg/ml 至约 50 mg/ml 的浓度存在。

18. 权利要求1的制剂, 其中该蛋白质具有至少6.0、7.0、或8.0的pI.

19. 权利要求1的制剂, 其中该制剂储存在约0°C至约8°C或约0°C至约5°C.

20. 权利要求1的制剂, 其中该制剂的pH是约pH 5.0至约pH 6.0.

21. 权利要求1的制剂, 其中该制剂的pH是约pH 5.0至约pH 6.0并且该制剂储存在约-80°C至5°C.

22. 权利要求1的制剂, 其中该蛋白质是人源化的抗-CD22抗体并且含水溶液是约20mM的琥珀酸盐, pH 6.0.

23. 权利要求1的制剂, 其中该蛋白质是抗-Lewis Y抗体并且该含水溶液是约10 mM柠檬酸钠, pH 5.5和约75 mM NaCl.

24. 权利要求1的制剂, 其中该蛋白质是抗-5T4抗体并且该含水溶液是约10 mM乙酸钠, pH 5.5.

25. 权利要求1的制剂, 其中稳定性通过与对照相比, 测定高分子量种类的百分比、低分子量种类的百分比、或酸性种类的百分比中的至少一个来确定.

26. 权利要求1的制剂, 其中该蛋白质纯化至少95%.

27. 权利要求1的制剂, 其中该制剂是无菌的.

28. 一种储存蛋白质的方法, 该方法包括

- (a) 提供权利要求1的制剂;
- (b) 将该制剂置于选择的温度; 以及
- (c) 在该选择的温度保持该制剂, 其中该制剂中的蛋白质稳定至少1周.

29. 权利要求28的方法, 其中该蛋白质稳定至少1个月、3个月、1年、5年、7年、或10年.

30. 权利要求29的方法, 其中该蛋白质在约-80°C或约2°C至约8°C的温度下是稳定的.

31. 权利要求28的方法, 其中该蛋白质储存在约-80°C的温度下并且该蛋白质稳定至少5年、7年、或10年.

32. 权利要求28的方法, 其中该制剂冷冻在选择的温度并且在步骤(c)后, 该蛋白质快速融化.

33. 权利要求 28 的方法, 其中该制剂在 (b) 中冷冻, 并且该冷冻是速冻。

34. 权利要求 28 的方法, 其中该蛋白质是抗体。

35. 权利要求 28 的方法, 其中该蛋白质是单克隆抗体。

36. 权利要求 28 的方法, 其中该蛋白质是抗 - CD22 抗体、抗 - Lewis Y 抗体或抗 - 5T4 抗体。

37. 权利要求 34 的方法, 其中该抗体是中间物质。

38. 权利要求 28 的方法, 其中该蛋白质浓度是至少 15 mg/ml, 至少 20 mg/ml, 或至少 30 mg/ml。

39. 权利要求 28 的方法, 其中当从储存物回收时, 该蛋白质具有至少 70% 的参照物活性。

40. 权利要求 28 的方法, 其中当从储存物回收时, 该制剂与参照物相比包括小于或等于 5% 的高分子量产物。

41. 权利要求 28 的方法, 其中当从储存物回收时, 该制剂与参照物相比包括小于或等于 10% 的高分子量产物。

42. 一种测定用于储存选择的分离蛋白的适宜制剂的方法, 该方法包括

(a) 提供选择的分离蛋白;

(b) 在包括约 pH 5.0 和约 pH 8.0 之间的含水溶液并且包括 0 mM 至 150 mM 缓冲液的一系列制剂中储存选择的分离蛋白;

(c) 测定稳定性的至少一个参数; 以及

(d) 鉴定使其中蛋白质稳定的制剂, 其中使该蛋白质稳定的制剂是用于储存分离的选择蛋白质的适宜制剂。

43. 权利要求 42 的方法, 其中稳定性的降低通过与对照相比, 样品中高分子量蛋白质的数量增加来指明。

44. 权利要求 43 的方法, 其中选择的条件是其中不超过 0.5%、0.2%、或 0.1% 的蛋白质是高分子量种类。

45. 权利要求 42 的方法, 其中稳定性的参数是通过酶联免疫分析测定的活性, 并且该活性是对照的至少 50%, 或是稳定制剂中对照的至少 80%。

46. 权利要求 42 的方法, 其中稳定性的参数是高分子量种类的存在, 并且与对照相比, 稳定制剂包括不超过 5% 的高分子量种类。

47. 权利要求 42 的方法, 其中稳定性的参数是高分子量种类和蛋白质聚集物的存在, 并且与对照相比, 稳定制剂包括不超过 10% 的高分子量种类和蛋白质聚集物或不超过 15% 组合的高分子量种类和蛋白质聚集物。

48. 权利要求 42 的方法, 其中稳定性的参数是酸性和碱性蛋白的比率, 并且稳定制剂中的比率与对照的不同不超过 15%。

49. 通过包括储存在权利要求 1 的制剂中的方法生产的多肽。

50. 权利要求 49 的方法, 其中该多肽是蛋白质。

51. 权利要求 49 的方法, 其中该蛋白质是抗体。

52. 用于制造经修饰的蛋白质的多肽, 其中该多肽储存在权利要求 1 的制剂中。

53. 权利要求 52 的多肽, 其中该多肽是抗体。

54. 权利要求 52 的多肽, 其中该多肽用于制造结合蛋白质。

55. 权利要求 54 的多肽, 其中该多肽与毒素结合。

稳定制剂

技术领域

[0001] 本申请涉及蛋白质制剂领域，更特别地涉及抗体制剂。

相关申请的相互参照

[0002] 本申请要求 2004 年 8 月 13 日提交的美国临时申请号 60/601311 的优先权，其全部内容在此引入作为参考。

背景

[0003] 蛋白质，例如抗体，经常被产生出来并储存备用。这种蛋白质被储存于使其在包括温度和蛋白质浓度的各种条件下保持稳定性的条件下是非常重要的。因此，用来储存蛋白质的制剂通常包含各种稳定物质。然而，这种物质可能通过减少下游加工效率，或由于必须在其用于下游加工前除去一种或多种稳定物质而对该储存蛋白质的下游使用产生不利地影响。

[0004] 目前，需要一种在各种温度稳定的蛋白质，例如抗体，的制剂，并且其不包含可能干扰应用该蛋白质进行下游加工的物质。

概述

[0005] 本发明涉及下述的发现，即某些制剂可用于储存多肽，例如蛋白质（如，抗体及其片段）以形成相对稳定和简单的制品。这种制剂减少了蛋白质的下游加工或活性可能受制剂成分不利影响的可能性，并且使短期或长期储存的蛋白质样品的制备简单化。

[0006] 本发明包括一种制剂，其包含经分离蛋白和 pH 4.0-8.0 的含水溶液，该制剂不包含防冻剂或表面活性剂，并且蛋白质在 -80°C 至 8°C 稳定至少 3 周。在一些情况下，该制剂包含少于 150 mM 的盐，例如 75 mM 的盐。该蛋白质可以是抗体（多克隆抗体或单克隆抗体）。例如，蛋白质可以是抗 - CD22 抗体、抗 - Lewis Y 抗体或抗 - 5T4 抗体。该蛋白质可以是重组蛋白质（例如，人源化的单克隆抗体）。在一些情况下，该蛋白质是治疗性的蛋白质。

[0007] 所述制剂的含水溶液可以是水（例如，过滤或无菌的），也可包括缓冲液，例如乙酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、或柠檬酸盐缓冲液。通常，该缓冲液的浓度是约 0 mM 至约 150 mM，

例如, 约 50 mM, 约 100 mM, 或约 1 mM 至约 50 mM。

[0008] 该制剂的蛋白质成分在 5°C 通常稳定至少 1 年, 例如该蛋白质在 5°C 稳定至少 3 年。在一些实施方案中, 蛋白质以约 1 mg/ml 至约 200 mg/ml、约 1 mg/ml 至约 100 mg/ml、约 20 mg/ml 至约 200 mg/ml、约 20 mg/ml 至约 100 mg/ml、约 10 mg/ml 至约 30 mg/ml、25 mg/ml 至约 30 mg/ml、约 10 mg/ml 至约 50 mg/ml、或约 20 mg/ml 至约 50 mg/ml 的浓度存在。蛋白质可能具有至少 6.0, 例如至少 7.0, 或至少 8.0 的 pI。该蛋白质可以被纯化至例如至少 90% 或至少 95%。

[0009] 有些情况下, 该制剂储存在约 0°C 至约 8°C 或约 0°C 至约 5°C。该制剂的 pH 可以是约 5.0 至约 pH 6.0, 在一些情况下, 该制剂的 pH 是约 5.0 至约 6.0, 并且该制剂储存在约 -80°C 至约 5°C。通常, 该制剂是无菌的。

[0010] 在本发明的实例中, 该制剂的蛋白质还可以是例如人源化的抗 - CD22 抗体和约 20mM 琥珀酸盐, pH 6.0 的含水溶液。在本发明另外的实例中, 该蛋白质是抗 - Lewis Y 抗体并且该含水溶液是约 10 mM 的柠檬酸钠, pH 5.5 和约 75 mM 的 NaCl。在本发明的又一个实例中, 蛋白质是抗 - 5T4 抗体并且含水溶液是约 10 mM 的柠檬酸钠, pH 5.5。

[0011] 可通过测定, 例如高分子量种类 (high molecular weight species) 的百分比、低分子量种类 (low molecular weight species) 的百分比、或酸性种类的百分比中的至少一个, 将其与对照相比来确定制剂的稳定性。

[0012] 在另一的方面, 本发明涉及储存蛋白质的方法。该方法包括提供如上所述的制剂, 将该制剂置于选择的温度, 并且在该温度 (例如, 冷冻) 保持该制剂, 以使得该制剂中的蛋白质稳定至少 1 周, 例如, 至少 1 个月、3 个月、1 年、5 年、7 年、或 10 年。在一些情况下, 蛋白质在约 2°C 至 8°C 的温度下储存和稳定。在某些实施方案中, 蛋白质储存在约 -80°C, 并且该蛋白质稳定至少 5 年、7 年、或 10 年。当蛋白质被冷冻时, 该方法可包括使其中的蛋白质被快速融化的步骤。当蛋白质需要被冷冻, 例如用于储存时, 其可通过速冻来冷冻。在一些情况下, 使用缓慢冷冻。蛋白质可以是抗体 (单克隆抗体或多克隆的抗体)。在一个实例中, 蛋白质是人源化的抗 - CD22 抗体、抗 - Lewis Y 抗体或抗 - 5T4 抗体。在某些实施方案中, 抗体是中间物质。通常,

蛋白质以至少 1 mg/ml, 至少 10 mg/ml, 至少 15 mg/ml, 至少 20 mg/ml, 或至少 30 mg/ml 的浓度存在。当从储存物回收时, 蛋白质可能具有例如至少 70% 的参照活性。在一些情况下, 当从储存物回收时, 制剂与对照相比包含小于或等于 5% 的高分子量产物, 或当从储存物回收时, 该制剂例如与对照相比包含小于或等于 10% 的高分子量产物和聚集物。在一些实施方案中, 制剂包含小于或等于 10% 的高分子量产物, 例如, 小于或等于 5% 的高分子量产物。

[0013] 在另外的方面, 本发明涉及测定适宜储存所选择的分离蛋白的制剂的方法。该方法包括提供选择的分离蛋白, 将该选择的分离蛋白储存在包括 pH 4.0 和 pH 8.0 之间的含水溶液, 并且包括约 0 mM 至约 150 mM 之间的缓冲液的一系列制剂中, 测定稳定性相关的至少 1 个参数, 鉴定其中蛋白质保持稳定的制剂, 其中蛋白质保持稳定的制剂是适于储存分离的所选择蛋白质的制剂。在该方法的一些实施方案中, 稳定性的降低通过例如与对照相比, 样品中高分子量蛋白质的数量有增加、与对照相比样品中低分子量种类的数量有增加、或与对照相比酸性种类的百分比增加中的至少一个来表明。在一些情况下, 选择的条件是其中不超过 0.5%、0.2%、或 0.1% 的蛋白质是高分子量种类。稳定性的参数可以通过酶联免疫分析 (ELISA) 测定的活性, 并且在稳定的制剂中该活性是对照的至少 50%, 或是对照的至少 80%。在该方法的实例中, 稳定性的参数是高分子量种类的存在并且稳定制剂包含不超过 5% 的高分子量种类。在另外的实例中, 稳定性的参数是高分子量种类和蛋白质聚集物的存在, 并且稳定制剂包括不超过 10% 的高分子量种类和蛋白质聚集物, 或不超过 15% 的高分子量种类和结合的蛋白质聚集物。在一些情况下, 将高分子量种类的百分比与对照样品 (例如, 储存之前的样品中存在的数量相比。在该方法的另一实施方案中, 稳定性的参数是酸性和碱性蛋白的比率, 并且稳定制剂中的比率与对照的差异不超过 15%。

[0014] 本发明也涉及通过包括将多肽储存在包括 pH 4.0 至 pH 8.0 含水溶液的制剂中, 以使得该制剂不包含表面活性剂或防冻剂, 并且该蛋白质在 -80°C 至 8°C 稳定至少 3 周的方法所产生的多肽 (蛋白质或多肽)。在一些实施方案中, 多肽是抗体或其片段 (例如, 抗 - CD22, 和抗 - Lewis Y, 或抗 - 5T4)。抗体或其片段可被结合至分子或可用

于与分子结合，例如结合至毒素，例如蓖麻毒素或加利车霉素。

[0015] 在一些实施方案中，本发明也涉及用于制造经修饰的蛋白质的多肽(蛋白质或肽)，以使得所述多肽储存在包括 pH 为 4.0 至 pH 8.0 的含水溶液的制剂中，所述制剂不包含表面活性剂或防冻剂，并且该蛋白质在 -80°C 至 8°C 稳定至少 3 周。在一些情况下，多肽是抗体，例如抗 - CD22、抗 - Lewis Y、或抗 - 5T4。该多肽可用于制造结合蛋白质，例如用于结合至毒素，例如蓖麻毒素或加利车霉素。这种结合蛋白质还可以保存在在此描述的制剂中。

[0016] 除另外定义的以外，本说明书中使用的全部技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常理解的具有相同的意义。下面将描述适宜应用于本发明的方法和材料，然而，应当理解的是，与在此描述的那些相似的方法和材料或等效物均可用于实现或测试本发明。在此提及的全部出版物、专利申请、专利、及其他参考文献全部引入本申请作为参考。此外，材料、方法、和实例只是示例性的，其不视为对本发明进行限制。

[0017] 参照下述详细说明、附图、和权利要求来看，本发明的其他特性和优势也是显而易见的。

附图简述

[0018] 图 1A 是描绘 1 mg/ml 抗 - Lewis Y 在各种 pH 和各种温度下的空间排阻层析-高效液相色谱法 (SEC - HPLC) 分析结果的直方图。结果表示为高分子量 (HMW) 种类的百分比。

[0019] 图 1B 是描绘 1 mg/ml 抗 - Lewis Y 在各种 pH 和各种温度下的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为低分子量 (LMW) 种类的百分比。

[0020] 图 2 是描绘 1 mg/ml 抗 - Lewis Y 在各种 pH 和各种温度下的 CEX-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为酸性种类的百分比。

[0021] 图 3 是抗 - Lewis Y 样品在各种 pH 下储存在 40°C 4 周的 SDS-PAGE 的描述。左侧图像是在非还原条件下的电泳的凝胶，右侧图像是在还原条件下电泳的凝胶。

[0022] 图 4 是如图 3 所描述的样品的等电聚焦 (IEF) 凝胶的描述。

[0023] 图 5 是描绘在各种 pH 和各种温度培养 2 周的 0.5 mg/ml 抗 - CD22 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 HMW 种类的

百分比。

[0024] 图 6 是描绘在存在或不存在 75 mM NaCl 时, 在各种 pH、各种温度培养 2 周的 25 mg/ml 抗 - CD22 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0025] 图 7A 是描绘在存在或不存在 75 mM NaCl 时, 在各种 pH 于 40°C、在各种缓冲液中培养 4 周的 1 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0026] 图 7B 是描绘在存在或不存在 75 mM NaCl 时, 在各种 pH 于 40°C、在各种缓冲液中培养 4 周的 1 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 LMW 种类的百分比。

[0027] 图 8 是描绘在存在或不存在 75 mM NaCl 时, 在各种 pH 于 40°C、在各种缓冲液中培养 4 周的 1 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 CEX-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为酸性种类的百分比。

[0028] 图 9A 是描绘在 10mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中, 在各种温度和各种 NaCl 浓度培养 4 周的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 CEX-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为酸性种类的百分比。

[0029] 图 9B 是描绘 9A 描述的样品的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0030] 图 9C 是描绘 9A 描述的样品的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 LMW 种类的百分比。

[0031] 图 10 是描绘在各种盐浓度并且经受摇动的 1 mg/ml 或 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 结果的直方图。结果表示为单体回收的百分比。

[0032] 图 11A 是描绘如图 11B 中所表明的 10 个冻融循环后, 在存在或不存在 150 mM NaCl 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中的 1 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 结果的直方图。结果表示为单体回收的百分比。

[0033] 图 11B 是描绘如表明的 10 个冻融循环后, 在存在或不存在 150 mM NaCl 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为单体回收的百分比。

[0034] 图 12 是描绘在存在或不存在 75 mM NaCl 时, 在 50 mM 琥珀酸盐, pH 6.0 中在各种温度培养 1 个月的 25 mg/ml 抗 - CD22 的

SEC-HPLC 分析结果的直方图。

[0035] 图 13 是描绘在 20 mM 琥珀酸盐, pH 6.0, 琥珀酸盐加 75 mM NaCl, 琥珀酸盐加 0.01% 聚山梨酸酯 80, 或琥珀酸盐加 75 mM NaCl 和聚山梨酸酯 80 (Tween) 中的 15 mg/ml 抗-CD22 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。样品在分析前摇动 24 小时。包括在琥珀酸盐缓冲液中的蛋白质的非摇动对照。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0036] 图 14A 是描绘在存在或不存在 75 mM NaCl 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中于 40°C 培养 4 周的 1 mg/ml 或 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 HMW 种类百分比的变化。

[0037] 图 14B 是描绘在存在或不存在 75 mM NaCl 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中于 40°C 培养 4 周的 1 mg/ml 或 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 LMW 种类百分比的变化。

[0038] 图 14C 是描绘在存在或不存在 75 mM NaCl 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中于 40°C 培养 4 周的 1 mg/ml 或 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 CEX-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为酸性种类百分比的变化。

[0039] 图 15A 是描绘在各种温度, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 和 75 mM NaCl 中培养各种时间的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0040] 图 15B 是描绘在各种温度, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 和 75 mM NaCl 中培养各种时间的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 LMW 种类的百分比。

[0041] 图 15C 是描绘在各种温度, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 和 75 mM NaCl 中培养各种时间的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 CEX-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为酸性种类的百分比。

[0042] 图 16A 是描绘在 20 mM 琥珀酸盐, pH 6.0 中, 并且在各种冻融方案下处理多个循环的 1 mg/ml 抗 - CD22 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。FF 是速冻, FT 是速融, SF 是慢冻, 以及 ST 是慢融。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0043] 图 16B 是描绘在 20 mM 琥珀酸盐, pH 6.0 中, 并且在各种

冻融方案下处理多个循环的 25 mg/ml 抗 - CD22 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。FF 是速冻, FT 是速融, SF 是慢冻, 以及 ST 是慢融。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0044] 图 16C 是描绘在包含聚山梨酸酯 80 的 20 mM 琥珀酸盐, pH 6.0 中, 并且在各种冻融方案下处理多个循环的 1 mg/ml 抗 - CD22 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。FF 是速冻, FT 是速融, SF 是慢冻, 以及 ST 是慢融。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0045] 图 16D 是描绘在包含聚山梨酸酯 80 的 20 mM 琥珀酸盐, pH 6.0 中, 并且在各种冻融方案下处理多个循环的 25 mg/ml 抗 - CD22 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。FF 是速冻, FT 是速融, SF 是慢冻, 以及 ST 是慢融。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0046] 图 17A 是描绘利用 SEC-HPLC 分析的摇动研究结果的直方图, 其中在存在或不存在聚山梨酸酯 80 中, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中的 1 mg/ml 或 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 在室温下以 360 rpm 摇动 24 小时。结果表示为单体回收的百分比。

[0047] 图 17B 是描绘利用 SEC-HPLC 分析的摇动研究结果的直方图, 其中在含各种浓度聚山梨酸酯 80 的 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 在室温下以 360 rpm 摇动 24 小时。结果表示为单体回收的百分比。

[0048] 图 18A 是描绘在如图 18B 表明的 10 个冻融循环后, 在存在或不存在 0.01% 聚山梨酸酯 80 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中的 1 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为单体回收的百分比。

[0049] 图 18B 是描绘在如表明的 10 个冻融循环后, 在存在或不存在 0.01% 聚山梨酸酯 80 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为单体回收的百分比。

[0050] 图 19A 是描绘在各种温度培养各种时间后, 在存在或不存在聚山梨酸酯 80 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 和 75 mM NaCl 中的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0051] 图 19B 是描绘在各种温度培养各种时间后, 在存在或不存在

聚山梨酸酯 80 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 和 75 mM NaCl 中的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为 LMW 种类的百分比。

[0052] 图 19C 是描绘在各种温度培养各种时间后, 在存在或不存在聚山梨酸酯 80 时, 在 10 mM 柠檬酸钠, 75 mM NaCl, pH 5.5 中的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 CEX-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为酸性种类的百分比。

[0053] 图 20A 是描绘抗 - CD22 的 6 个月储存稳定性的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。溶液包含 20 mM 琥珀酸盐, pH 6.0 (S); 20 mM 琥珀酸盐, 10 mM 甲硫氨酸, pH 6.0 (SM); 20 mM 琥珀酸盐, 0.01 聚山梨酸酯 80, pH 6.0 (ST); 或 20 mM 琥珀酸盐, 10 mM 甲硫氨酸, 0.01 聚山梨酸酯 80, pH 6.0 (SMT)。结果表示为 HMW 种类的百分比。

[0054] 图 20B 是描绘抗 - CD22 的 6 个月储存稳定性的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。溶液包含 20 mM 琥珀酸盐, pH 6.0 (S); 20 mM 琥珀酸盐, 10 mM 甲硫氨酸, pH 6.0 (SM); 20 mM 琥珀酸盐, 0.01 聚山梨酸酯 80, pH 6.0 (ST); 或 20 mM 琥珀酸盐, 10 mM 甲硫氨酸, 0.01 聚山梨酸酯 80, pH 6.0 (SMT)。结果表示为总峰面积的百分比。

[0055] 图 20C 是描绘抗 - CD22 的储存稳定性的 CEX-HPLC 分析结果的直方图。条件如图 20A 和 20B 所描述。结果表示为完全活性种类的百分比 (%峰值 5)。

[0056] 图 21 是描绘在各种 pH 和温度储存 2 周的抗 - 5T4 的高分子量产物 (HMW) 的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。结果表示为高分子量产物的平均百分比。

[0057] 图 22 是描绘在各种 pH, 最初或于 40° C 在乙酸盐缓冲液 (Ace), 柠檬酸盐缓冲液 (Cit), 磷酸盐缓冲液 (Phos), 或琥珀酸盐缓冲液 (Suc), 有或没有盐 (NaCl) 中 4 周后的抗 - 5T4 样品中高分子量产物 (HMW) 或低分子量产物 (LMW) 百分比的 SEC-HPLC 分析结果的直方图。

[0058] 图 23A 是描绘在柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.5) 中的抗 - 5T4 的差示扫描量热法 (DSC) 结果的热图。

[0059] 图 23B 是描绘在琥珀酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中的抗 - 5T4 的

差示扫描量热法 (DSC) 结果的热图。

[0060] 图 24A 是描绘抗 - 5T4 在没有 NaCl 的各种制剂中, 以及在各种 pH 的 DSC 结果的直方图。

[0061] 图 24B 是描绘抗 - 5T4 在含有 150 mM NaCl 的各种制剂中, 在各种 pH 的 DSC 结果的直方图。

[0062] 图 25 是描绘抗 - 5T4 在包含各种缓冲液, 有或没有 150 mM NaCl, 在各种 pH 的制剂中, 在 40°C 4 周后的 CEX-HPLC 结果的直方图。

[0063] 图 26A 是描绘抗 - 5T4 (2 mg/ml) 在各种缓冲液, 在各种 pH 中, 于 -80°C 或 40°C 6 周后的 SEC-HPLC 结果的直方图。

[0064] 图 26B 是描绘抗 - 5T4 (30 mg/ml) 在柠檬酸盐或琥珀酸盐缓冲液, pH 6 中, 于 -80°C 或 40°C 6 周后的 SEC-HPLC 结果的直方图。

[0065] 图 27A 是描绘抗 - 5T4 (2 mg/ml) 在各种缓冲液制剂, 各种 pH 中, 于 40°C 6 周后的 CEX-HPLC 结果的直方图。

[0066] 图 27B 是描绘抗 - 5T4 (30 mg/ml) 在柠檬酸盐或琥珀酸盐缓冲液, pH 6 中, 于 40°C 6 周后的 CEX-HPLC 结果的直方图。

[0067] 图 28 是描绘抗 - 5T4 在各种缓冲液制剂, 各种 pH 中, 于 40°C 6 周后的 SDS 凝胶中毛细管电泳结果的一组叠加电泳图谱的再现。

[0068] 图 29A 是描绘在不同的冻融方案下, 在包含各种缓冲液 (pH 5.5) 以及有或没有聚山梨酸酯 80 (P80), 以及有或没有蔗糖的制剂中 1 mg/ml 抗 - 5T4 的 A_{400} 的直方图。FF 是速冻, SF 是慢冻, FT 是速融, 以及 ST 是慢融。

[0069] 图 29B 是描绘在不同的冻融方案下, 在包含各种缓冲液 (pH 5.5) 以及有或没有聚山梨酸酯 80 (P80), 以及有或没有蔗糖的制剂中 1 mg/ml 抗 - 5T4 的高分子量 (HMW) 种类百分比的直方图。FF 是速冻, SF 是慢冻, FT 是速融, 以及 ST 是慢融。

[0070] 图 30A 是描绘在不同的冻融方案下, 在包含各种缓冲液 (pH 5.5) 以及有或没有聚山梨酸酯 80 (P80), 以及有或没有蔗糖的制剂中 25 mg/ml 抗 - 5T4 的 A_{400} 的直方图。FF 是速冻, SF 是慢冻, FT 是速融, 以及 ST 是慢融。

[0071] 图 30B 是描绘在不同的冻融方案下, 在包含各种缓冲液 (pH

5.5) 以及有或没有聚山梨酸酯 80 (P80), 以及有或没有蔗糖的制剂中 25 mg/ml 抗 - 5T4 的高分子量 (HMW) 种类百分比的直方图。FF 是速冻, SF 是慢冻, FT 是速融, 以及 ST 是慢融。

[0072] 图 31A 是描绘 1 mg/ml 或 25 mg/ml 抗 - 5T4 在有或没有聚山梨酸酯 80 (P80) 以及有或没有蔗糖的各种制剂中的 A_{400} 的直方图。样品是摇动或不动摇的。“*” 表明混浊度超过仪器的上限。

[0073] 图 31B 是描绘 1 mg/ml 或 25 mg/ml 抗 - 5T4 在有或没有聚山梨酸酯 80 (P80) 以及有或没有蔗糖的各种制剂中的高分子量种类 (HMW) 百分比的直方图。样品是摇动或不动摇的。

发明详述

[0074] 本发明提供相对简单的用于储存蛋白质的制剂, 所述蛋白质例如单克隆抗体、包含单克隆抗体的药物, 或蛋白质产物生产中的中间物质, 例如包含抗体的药物。该制剂通常包含低至没有表面活性剂, 没有至相对低的盐浓度, 以及需要相对低的缓冲液浓度。该制剂对于以相对宽范围的蛋白质浓度、pH、和缓冲液类型稳定储存某些蛋白质, 例如抗体是有效的。这种制剂可为进一步的加工, 例如使得蛋白质容易地可调节至所需要的 pH、加入赋形剂、化学修饰、或冻干提供很大的灵活性。该制剂还可用于储存肽和经加工的蛋白质, 例如结合至其他肽或非肽部分的蛋白质, 例如抗体。

[0075] 本发明还提供特定的非限制实例来阐明鉴定适于储存 3 种不同抗体, 抗 - CD22、抗 - Lewis Y、和抗 - 5T4 的制剂的方法, 这些抗体可用作例如中间物质来制造通过使该抗体结合至, 例如细胞毒素的化合物而制备的药物。中间物质通常是用于制造, 例如药物的化合物的物质, 通常指蛋白质 (例如抗体)。

制剂

[0076] 在此描述的制剂通常包括在约 pH 3.0-9.0, 例如约 pH 4.0-8.0, 约 pH 5.0-6.5, 或约 pH 5.5-6.0 的含水溶液中的分离蛋白。该制剂不包含防冻剂或表面活性剂。通常, 该制剂不包含防腐剂。

[0077] 在此描述的制剂不包含防冻剂。防冻剂是本领域已知的, 并且包括例如, 单糖 (例如, 葡萄糖、果糖、麦芽糖、核糖、甘露糖、和木糖); 二糖 (例如, 海藻糖、蔗糖、纤维二糖, 和乳糖); 三糖

(例如、棉子糖);糖醇(例如,甘露醇、山梨糖醇、肌醇、磷酸化环己六醇、和丙三醇);多糖(例如、羟乙基淀粉(HES)、葡聚糖、磷酸化葡聚糖、肝素、肝素硫酸酯、透明质酸、皮肤素硫酸酯、软骨素硫酸酯,和琼脂糖);羧酸(例如,丙酮酸和2,3,-二磷酸甘油酸);和用于保护剂效应的蛋白质或蛋白质混合物(例如,血液、动物血清、血浆、人白蛋白、牛白蛋白、牛明胶、和鱼胶)。

[0078]新的制剂不包含表面活性剂(当以极低浓度使用时能够减少水的表面张力的试剂)。表面活性剂是本领域已知的并且包括例如,聚山梨酸酯80、聚山梨酸酯20、和Pluronic®表面活性剂。

[0079]通常,新的制剂不包含防腐剂。防腐剂是本领域已知的,并且包括抗菌剂和抗真菌剂,例如叠氮化钠、包含汞的化合物,例如硫柳汞、二甲苯酚、抗生素、异噻唑酮和两性霉素。

缓冲液

[0080]制剂可以是在缓冲液中,所谓缓冲液指使溶液的pH保持在可接受范围内的试剂。缓冲液可包括例如,柠檬酸盐、乙酸盐、组氨酸、葡萄糖酸盐、琥珀酸盐、磷酸盐、Tris(三(羟甲基氨基甲烷))、二乙醇胺、HEPES、或其他的有机酸缓冲液。适合与蛋白质一起使用的其他缓冲液是本领域已知的。某些制剂排除使用胺类缓冲液。在包含缓冲液的制剂中,该缓冲液通常以大于0 mM至150 mM的浓度范围存在。在一些情况下,缓冲液浓度是约50 mM至约100 mM或约1 mM至约50 mM。例如该缓冲液浓度可以是约10 mM至20 mM。在一些情况下,可使用缓冲液的组合,例如HEPES和Tris缓冲液可组合使用。

[0081]其他的因素可用于选择缓冲液。例如,胺类缓冲液,例如Tris或组氨酸缓冲液不适于某些结合方法,因此不适合包含于可能在结合方法中使用的蛋白质的制剂中。

[0082]通常,用于制剂的盐的浓度表示为加入的盐,并且不考虑例如,由缓冲液提供的钠或在稀释成为制剂前存在于蛋白质样品中的盐。

[0083]制剂可利用本领域已知的方法来制备。例如,透析可用于将所需pH的缓冲液以及,任选地将盐导入包含感兴趣的蛋白质的制剂。通常,提供包含感兴趣的分离蛋白的起始样品。在一些情况下,例如当起始样品在稀释成为制剂前是高蛋白浓度时,不必考虑起始样品的

pH 或盐量。当利用包含极高盐浓度或高缓冲液浓度的起始样品来制备制剂时，通常使用除去或减少起始样品中非蛋白质成分的制备蛋白质的方法（例如，渗析）。

稳定性

[0084] 在此描述的制剂的特性是当该制剂在 -80°C 至 8°C 储存时该制剂的蛋白质（例如抗体）成分至少稳定不少于 3 周的指定时段。通常，制剂中的蛋白质成分在 5°C 稳定至少 1 年。稳定性泛指蛋白质的构型稳定性和/或活性稳定性。就制剂而论，如果它符合在此提供的稳定性的至少一个参数，则蛋白质是稳定的。通常，需要使在蛋白质储存期间聚集的高分子量种类的形成最小化。因此，稳定性的一个参数是经过储存的制剂中可能发生的高分子量种类数量的任何增加均小于对照。例如，在制剂中储存后样品中高分子量种类的百分比与对照相比没有显著增加。通常，对照是在没有实验条件（例如，在 -80° 至 8°C 下 3 周）下经受储存的制剂的重复。一些情况下，储存后高分子量种类中制剂的蛋白质成分的百分比是总蛋白质的 10%或更少，总蛋白质的 5%或更少，是总蛋白质的 3%或更少，或是总蛋白质的 2%或更少。测定高分子量种类的方法是本领域已知的并且包括 SEC-HPLC、SDS-PAGE、毛细管电泳、和空间排阻层析。

[0085] 可被测定的另外参数是在经过储存的制剂中可能出现的低分子量种类数量的增加。通常，需要使储存期间低分子量种类的聚集最小化。例如，在制剂中储存后样品中低分子量种类的百分比与对照相比没有显著增加。一些情况下，储存后高分子量种类中制剂的蛋白质成分的百分比是总蛋白质的 10%或更少，总蛋白质的 5%或更少，是总蛋白质的 3%或更少，或是总蛋白质的 2%或更少。低分子量种类可利用本领域已知的方法测定，例如，SEC-HPLC。

[0086] 在各种条件下储存后制剂中酸性和碱性种类的比率可与对照中的比率相比较。通常，测定表现出脱酰胺基的酸性种类的百分比。酸性种类的百分比增加表现出稳定性降低。例如，与对照相比，稳定的制剂通常在选择的条件下显示不超过 10%的酸性种类百分比增加。样品中酸性种类百分比的测定方法是本领域已知的，例如，CEX-HPLC。一些情况下，碱性种类的存在利用本领域已知的方法来测定。存在于储存在制剂中的蛋白质中的碱性种类的百分比或类型的变化表

现出该制剂中蛋白质种类的稳定程度。

[0087]稳定性的另一参数可以是聚集物和 HMW 种类的增加，如果有任何增加，其小于或等于对照中聚集物和高分子量种类数量的 10%。聚集物通常是不进入可用于分离制剂蛋白质成分的凝胶、柱或其他分离介质的样品中的物质。制剂中高分子量种类加聚集物的测定方法是本领域已知的，并且包括聚丙烯酰胺凝胶电泳、空间排阻层析、毛细管电泳、和光散射。

[0088]可以测定蛋白质的效价或活性，将其用作制剂稳定性的参数。就抗体来说，可使用免疫测定（例如，酶联免疫吸附测定（ELISA））。当使用免疫测定或其他活性测定时，如果它与对照活性相比在免疫测定中保持其活性的至少 50%，则制剂中的抗体是稳定的。一些情况下，如果该蛋白质保持其活性的至少 20%，则该制剂是稳定的。

[0089]也测定与稳定性相关的其他参数用于评估制剂。例如，可测定摇动后制剂中蛋白质的稳定性。这可能是重要的参数，因为需要样品在运输期间保持稳定。伴有摇动的制剂的稳定性通常通过使样品经受摇动（例如，360 rpm）一段时间后（例如，12 小时、24 小时、48 小时、或更长），然后测定是否存在表现出不稳定性的产物（例如，高分子量种类、低分子量种类、或酸性种类）相对于对照有增加来测定。

[0090]本领域已知的其他方法可用于评估制剂中蛋白质的稳定性。这种方法的实例包括提供二级和三级结构信息的圆二色光谱、荧光光谱学（例如，在存在 Bis-ANS 时，其结合作为展开指标的疏水性片段）、差示扫描量热法（DSC，其监测整体的热展开），和超滤/渗滤。

[0091]可采用多于一个的参数来评估蛋白质的稳定性。

温度

[0092]在此描述的某些制剂的优点在于它们提供在最小溶液中储存蛋白质的方法，以使得该蛋白质随着时间和在一定的温度变化范围内不显示显著的降解或聚集作用。通常，制剂中的蛋白质或肽在约 80°C 至约 40°C 或约 -80°C 至约 8°C（例如，至约 5°C）的温度范围稳定至少 3 天（例如，2 周或 4 周）。一些情况下，需要制剂稳定持续的

时间, 例如至少 2 个月、3 个月、6 个月、9 个月、1 年、3 年、5 年、7 年、或 10 年。

[0093] 此外, 包括在制剂中的蛋白质可能在重复的冻融循环中显示显著的稳定性, 并且这种处理后, 在融化后能够保持稳定。通常, 待冷冻的制剂被速冻, 例如在液氮中冷冻。融化可以是在一定的温度范围, 例如约 0°C 至约 25°C 的慢融; 或约 26°C 至 40°C 的速融。速融的实例是在 37°C 水浴中融化该制剂。制剂中的蛋白质可稳定至少 1 个冻融循环, 至少 5 个冻融循环, 或至少 10 个冻融循环。

[0094] 有时需要测定冻融制剂的最适方案以使其保持稳定性, 或可能需要鉴定为将要经受特殊冻融循环的蛋白质提供最大稳定性的制剂。因此, 在一些实施方案中, 评估这个参数。例如, 可分析测试制剂在多种冻融条件, 例如速冻、慢冻、速融、慢融的各种组合下的稳定性, 来确定产生更少降解产物 (例如, 具有最大的稳定性) 的方法。

多肽

[0095] 用于在此描述的制剂的多肽通常是分离的蛋白质。"分离的"蛋白质基本上不含多孔材料或来自衍生该蛋白质的细胞或组织来源的其他污染蛋白质, 或当化学合成时, 基本上不含化学前体或其他化学品。措辞"基本上不含"意味着分离蛋白的制品具有的其他蛋白质 (在此也是指"污染蛋白质"), 或化学前体少于约 30%、20%、10% 或 5% (干重)。当分离蛋白被重组生产时, 它通常也基本上不含培养基, 即培养基表现少于蛋白质制品体积的约 20%、少于约 10%、或少于约 5%。

[0096] 一些情况下, 蛋白质的组合用于制剂。例如, 将被制备作为药物的 2 个不同抗体可在相同的制剂中储存在一起。抗体还可与协同其他类型或蛋白质或肽, 包括有毒肽的制剂一起使用。肽或蛋白质片段能够与该制剂一起使用, 例如, 抗体片段, 例如可使用 Fab 片段。

[0097] 通常, "蛋白质"是指全长的蛋白质或其片段。蛋白质可能相应于天然存在的蛋白质或其片段, 或来源于例如诱变或重组技术的遗传工程化的蛋白质, 或其片段。蛋白质有时候可能包括非蛋白质性质的部分, 例如可检测的分子 (例如, 荧光分子或放射性同位素)、毒素、药物、或小分子。蛋白质可能包含例如, 非天然存在的氨基酸。蛋白质可以是杂合蛋白。蛋白质可包括多于 1 个类型的分离蛋白质,

如抗体（例如，包含重链和轻链）或成熟的胰岛素蛋白质。可被使用的蛋白质片段的实例包括 Fab 片段或 Fc 片段。一些情况下，肽与制剂一起使用，或如上所述，至少一个蛋白质和至少一个肽或蛋白质片段的组合。蛋白质性质的毒素还可以，例如单独的、结合至另外的蛋白质或肽、或作为与另外的蛋白质或肽一起的单独实体保存在制剂中。通常，在此提供的制剂对于在此为蛋白质描述的任何多肽（蛋白质或肽）是有用的。

[0098] 肽是具有两个或多个共价连接的氨基酸（例如 5、10、15、20、30 或 50 个氨基酸）的化合物。通常，蛋白质是长度为至少 50 个氨基酸的多肽或多个多肽（例如，含有重链和轻链的抗体分子，或其部分）。

[0099] 该制剂还可用于储存结合至肽或非肽部分的多肽。这种部分的实例包括而不限于，荧光分子（例如，荧光素、若丹明、绿色荧光蛋白质（GFP）、红色荧光蛋白质（RFP）、Cy3、Cy3.5、Cy5、或 Cy5.5）、基本部分（例如，金颗粒）、药物、或毒素。将这种分子结合至多肽的方法是本领域已知的。分子的实例包括而不限于蓖麻毒素 (Mansfield et al., 1997, Blood 90:2020-2026; Ghetie et al., 1991, Cancer Res. 51:5876; Conry et al., 1995, J. Immunother. Emphas. Tumor Immunol. 18:231-241), *Pseudomonas* exotoxin A (PE) (Smith, 2001, Seattle Genetics Curr. Opin. Investig. Drugs 2(9):1314-1319; Mansfield et al., 1996, Bioconjug. Chem. 7:557)、紫杉烷（即，紫杉醇）(Guillemard et al., 2001, Cancer Res. 61: 694-699)、阿霉素 (doxorubicin)(Shouval et al., 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85:8276-8280; Takahashi et al., 1996, Anticancer Drugs 7(6):687-696; Shih et al., 1991, Cancer Res. 51(16):4192-4198; Shih et al., 1994, Cancer Immunol. Immunother. 38(2):92-98; Alexandru et al., 1999, Cancer Res. 59:115-121; Trail et al., 1993, Science 261:212-215)、葱 (Dias et al., 2005, Bioconjugate Chem. 16:949-958)、美登木素生物碱(Tassone et al., 2004, Cancer Res. 64:4629-4636; Tolcher et al., 2003, J. Clin. Oncol. 21(2):211-222)、阿霉素 (adriamycin) (Hurwitz et al., 1983, Ann. N.Y. Acad. Sci. 417:125-36; Takahashi et al., 1988, Gan No Rinsho 34:847-50; Deguchi et al., 1987, J. Urol. 137(2):353-358)、放射性同位素(Karube et

al., 1996, Nuclear Med. Biol. 23:753-759; Mishra et al., 2004, J. Drug Target. 12(9-10):559-567; Lee et al., 2001, Cancer Res. 61:4474-4482)、
氮甲蝶呤(Ryser et al., 1988 J. Cell Physiol. 135(2):277-284; Mandel et al., 1991, J. Cell Physiol. 149(1):60-65)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-
N,N',N'',N'''-乙二醇双乙胺醚(DOTA), 例如结合至另外的部分, 例如
90-钇 (Lu et al., 2005, J. Pharm. Sci. 94(4):788-797)、链霉抗生物素蛋白(Ngai et al., 1995, Nucl. Med. Biol. 22(1), 77-86)、放射性同位素结合的
产物(例如, 在 Biopharmaceutical Products in the U.S. Market, 4th Edition, Rader, ed., Biotechnology Information Institute, Rockville, MD, 2005 中列出的)、包括铪 (Tc) 99m、钇、和 In111 放射性结合物。

[00100] 通常制剂的蛋白质成分是具有比较高 pI 的蛋白质, 例如至少 6.0、7.0、8.0 或 8.5 的 pI。该蛋白质可能如在抗体中, 具有多于 1 个的肽链。当制剂的蛋白质成分是抗体时, 该抗体可以是多克隆或单克隆的, 或其片段(例如, Fab 片段)。蛋白质在制剂中存在的浓度是约 1mg/ml 至约 300mg/ml、约 1mg/ml 至约 200mg/ml、约 1mg/ml 至约 100mg/ml、约 1mg/ml 至约 50mg/ml、约 10mg/ml 至约 300mg/ml、约 10mg/ml 至约 200mg/ml、约 10mg/ml 至约 50mg/ml、约 10mg/ml 至约 30mg/ml, 或约 20 mg/ml 至约 50 mg/ml。用于在此描述的制剂的特殊抗体是人源化的单克隆抗 - CD22 抗体、单克隆抗 - Lewis Y 抗体, 和抗 - 5T4 抗体。

[00101] 用于制剂的分离蛋白通常是具有作为治疗剂的潜力或属于治疗剂部分的潜力的蛋白质。这种蛋白质在此与治疗剂蛋白质有关并且包括抗体。

[00102] 如在此描述可使用的特定蛋白质的实例包括抗体, 例如抗 - CD-22 (参见 US20040082764A1 和 US20040192900A1)、抗 - Lewis Y (WO 05/019271A1)、和抗-5T4 (参见 U.S. 系列号 60/608494)。

pH

[00103] 用于制剂的适宜 pH 条件在约 pH 4.0 至 pH 8.0 之间。通常, pH 是约 5.5-6.0。在约 5.5-6.0 的 pH, 包含单克隆抗体的制剂可在 0℃ 至约 8℃ (通常在约 1℃ 至约 5℃) 储存和保持稳定至少 3 个月, 例如 6 个月, 1 年, 或 2 年, 以及在例如 - 80℃ 长期储存 (至少 3 年、5 年、7 年、或 10 年)。

适宜制剂的鉴定

[00104] 在此描述的一些方法中，鉴定适宜的制剂来用于感兴趣的特定蛋白质。在这些方法中，鉴定分离蛋白，例如治疗性蛋白质，例如抗体以储存在例如在此描述的那些制剂中。蛋白质可以是待储存直到其用于下游加工的抗体，以制造结合至细胞毒素（例如加利霉素）用作治疗剂的抗体。其他的实例包括储存待结合至可检测的标记，例如荧光素、若丹明、或结合至聚乙二醇的抗体，继之以冻干法来用于更长久地储存该抗体。

[00105] 为了鉴定用于储存分离蛋白的适宜制剂，该蛋白质通常悬浮在 pH 范围为约 4.0-8.0（例如，pH 5.0-6.0）以及盐浓度范围为约 0 mM-150 mM 的一系列测试溶液中。这些测试溶液在各种温度储存指定的时段或几个不同的时间（例如 3 天、2 周、或 4 周）。然后评估样品的至少 1 个稳定性参数，例如高分子量种类、低分子量种类、酸性种类百分比的变化、或聚集物和高分子量种类数量的变化。然后选择其中的蛋白质成分稳定存在的制剂作为用于储存该种类样品适宜制剂。可进行附加的评估以评估稳定性的其他参数，例如冻融循环后或摇动后的稳定性。上文提供的实例为用于储存特殊分离蛋白的适宜制剂的鉴定方法提供了附加的指导。

储存蛋白质的方法

[00106] 在此提供储存蛋白质或肽（例如，抗体、抗体片段、或结合至肽或非肽部分的蛋白质）的方法。该方法对储存蛋白质，例如抗体直到其需要进一步的配制特别有用，例如制造结合至细胞毒素的药物或制造可检测标记的试剂，或用于储存已经被改变，例如通过结合至肽或非肽部分的蛋白质。

[00107] 与包含稳定剂和/或防冻剂的制剂相比，将蛋白质（例如抗体）作为要求保护的制剂一部分进行储存可为下游加工提供更高的灵活性。

[00108] 制剂还可用于提供，例如，稳定的单克隆抗体药物物质，或用于进一步加工的药物物质中间制剂，例如与有效的抗癌剂结合、冻干，或用于肠胃外给药的液剂。通常该方法包括储存选择的分离蛋白为不包括表面活性剂，不包括防冻剂，并且具有相对低的缓冲液浓度（例如，约 10 mM 至约 20 mM）的含水溶剂的部分。通常，制

剂的盐浓度是相对低的,通常小于约 100 mM,例如,约 0 mM 至约 50 mM,约 1 mM 至约 20 mM,约 1mM 至约 10 mM,或约 5 mM 至约 10 mM。

[00109] 除上文描述和从权利要求显而易见的优点之外,如在此描述所储存的蛋白质在样品间具有优良的可重现性(例如,来自等分的单个制品的蛋白质样品和利用在此描述的制剂储存的等分样品)。此外,如在此描述所储存的蛋白质通常在储存后被有效加工,例如它们比用防冻剂和/或表面活性剂储存的蛋白质被更有效地结合。

实施例

[00110] 本发明进一步通过下列实施例加以说明。实施例只是示例性的,它们不应被看作是以任何方式限制本发明的范围或内容。

实施例 1: pH

抗-Lewis Y

[00111] 为了研究使抗体是稳定的 pH 范围,1 mg/ml 抗 - Lewis Y 的样品在 4 至 8 的 pH 范围,特别在 pH 4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、和 8.0 制备。在这个实施例和下列描述的实施例中,样品通常在 5 ml Teflon[®] PFA 小瓶 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL) 中,例如以 2 ml 的总样品体积制备。通过 Spectra Max[®] PLUS 分光光度计 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA),测定在 Costar[®] 96-孔 UV 平板 (Corning, Corning, NY) 中的样品在 280 nm 的 UV 吸光率来测定蛋白质浓度。蛋白质浓度利用指定的 $1.36 (\text{mg/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$ 吸光率系数来计算。样品通过含有选定 pH 的 10mM 磷酸钾缓冲液的 pH 缓冲液进行透析来制备。每个样品也包含 75mM NaCl。制备的样品被无菌过滤并置于 80℃ 冰箱中,或保持在 5℃ 或 40℃ 的稳定室内。4 周后,利用 SEC-HPLC (空间排阻层析-高效液相色谱法) 分析样品中存在的高分子量种类和低分子量种类。SEC-HPLC 分析利用 TosoHaas (Montgomeryville, PA) BIOSEP G3000SW_{XL} 作为分离柱,以本领域已知的方法进行。

[00112] 分析前冷冻样品在 37℃ 水浴中融化。

[00113] 高分子量种类的出现率随 pH 而增加,但高分子量种类不是与 pH 有关的主要降解产物 (图 1A)。在 40℃ 储存的样品的低分子量种类的 pH 分布图是 V 形的,其中在 pH 5.5 有低分子量种类的最小值 (图 1B)。因此,抗 - Lewis Y 抗体在 -80℃ 至 5℃ 的温度范围和 pH

4.0 至 8.0 的 pH 范围是稳定的。

[00114] CEX-HPLC (阳离子交换层析-HPLC) 用于进一步评估样品的稳定性。这些分析使用 Dionex (Sunnyvale, CA) ProPac WCX-10 柱进行。发现在 40°C 储存的样品中酸性种类的浓度在高 pH 增加 (图 2)。然而, 对于在 5°C 和 -80°C 储存的样品, 抗 - Lewis Y 在全部的 pH 范围内是稳定的, 证实了从 SEC-HPLC 数据得出的结论。

[00115] 作为评估稳定性的另一方法, SDS-PAGE 用于进一步分析在 40°C 储存的样品, 其利用 4-20% 凝胶在还原或非还原条件下电泳。在这些实验中, 证明最小量的分子量变化, 以及因此最大的稳定性属于在 pH 范围 5.0-6.0 内的样品 (图 3)。因此, 储存在 40°C 的样品 (例如抗体) 在约 5.0 和 6.0 之间的 pH 被最好地维持。

[00116] 等电聚焦 (IEF) 电泳用于进一步评估储存在 40°C 的样品。IEF 电泳用于监测作为蛋白质降解的结果而产生酸性种类的抗体样品的 pI 变化。

[00117] 与抗体样品的 SDS-PAGE 分析结果相一致, 5.0-5.5 的 pH 范围中的那些样品显示最小量的总蛋白质电荷变化 (图 4)。

[00118] 储存的一个重要方面是制剂经时的 pH 稳定性。因此, 在全部的 3 个温度储存实验的开始、2 周后, 和 4 周后分析样品的 pH。在任何样品中与开始的 pH 没有显著的偏离 (表 1)。

[00119]

表 1: 抗 - Lewis Y pH 筛选稳定性样品的 pH 测量

目标 pH	测量的 pH						
	时间 0	2 周			4 周		
		-80°C	5°C	40°C	-80°C	5°C	40°C
4.00	4.01	4.01	4.02	4.02	4.05	4.07	4.03
5.00	5.01	5.02	5.01	5.02	5.07	5.06	5.02
5.50	5.51	5.52	5.52	5.52	5.55	5.57	5.54
6.00	6.00	5.99	5.99	6.00	6.04	6.06	6.02
6.50	6.51	6.51	6.51	6.50	6.55	6.56	6.53
7.00	7.03	7.03	7.00	6.99	7.04	7.05	7.01
8.00	8.01	7.97	7.96	7.92	7.97	7.97	7.91

[00120] 上文提供的数据共同证明抗 - Lewis Y 在 80°C 至 5°C 的

温度范围内和 pH 4-8 的 pH 范围内是稳定的。通常，用于储存该抗体的适宜 pH 是约 5.5。这也提供用于在 40°C 储存抗体的相对有利的条件。

[00121] 通常，选择 pH 以使得储存蛋白质在两个或多个温度范围内保持稳定性，例如当样品在 0°C 下储存，当样品在约 0°C 和 15°C 间储存，以及当样品在约 15°C 和 40°C 间储存。在另外、非限制性的实施例中，样品在约 -80°C、5°C、和 40°C 储存。

抗-CD22

[00122] 也测试了 pH 对在正常和恶性的成熟 B 细胞表面表达的第二抗体(抗-CD22)，即靶向 CD22 的人源化的 IgG4 抗体储存的影响。抗-CD22 的理论 pI 是约 8.5。然而水解可能在 pH 5.0 以下发生，脱酰胺基作用在可能大于 7.5 的 pH。因此设计实验在 pH4 至 8 的范围测试 pH 对蛋白质稳定性的影响，评估稳定性-显示分析方法的能力，以及提供用于蛋白质储存制剂的合适 pH 的理论基础。

[00123] 制备包含抗-CD22 的样品，在待测试 pH 值的各种缓冲液中包含 0.5 mg/ml 抗-CD22。样品在 5°C、25°C、或 40°C，在 pH 4.0 (10 mM 琥珀酸盐)、5.0 (10 mM 柠檬酸盐)、5.5 (10 mM 琥珀酸盐)、6.0 (10 mM 组氨酸)、6.5 (10 mM 组氨酸)、7.0 (10 mM 磷酸盐)、或 8.0 (10 mM Tris) 储存 2 周。利用 SEC-HPLC 分析样品中高分子量种类的百分比。对于这些样品中(各包含 0.5 mg/ml 抗-CD22)，2 周后，与初始条件下相比，pH5.0 至 8.0 的范围内样品中存在的高分子量种类在数量上没有显著的增加(图 5)。

[00124] 例如，当将抗-CD22 的抗体用于进一步(下游)加工时，必须考虑到在适于进一步加工的缓冲液中存在中间物质的因素。例如，可在不包含伯胺，pH 7 至 8.5 的缓冲液中进行加利车霉素与抗-CD22 的结合(conjugation)。然而，在结合缓冲液中可能不是必须提供中间物质的。在这个实施例中，中间物质制剂可能是受约束的，因为缓冲液成分中的伯胺会干扰结合过程。为了研究蛋白质在不包含伯胺的溶液中的储存，进行实验，其中抗-CD22 被浓缩至 25 mg/ml 并且过滤或经 50 mM HEPES (pH 7.6)、50 mM 琥珀酸盐 (pH 6.0)，或 50 mM 琥珀酸盐+50 mM HEPES (pH 7.0) 透析。测试每个样品的稳定性达到 2 周。用或不用 75 mM NaCl 制备样品并且储存在 -80°C、4°C

或 40°C。在时间= 0、1 周、和 2 周通过 A₂₈₀/A₃₂₀, SEC-HPLC, SDS-PAGE, 和 IEF (在 2 周)分析样品。

[00125] 来自这些实验的数据证明 pH 6.0 (琥珀酸盐缓冲液) 比 pH 7.0 (HEPES)或 pH 7.6 下的组合 (HEPES 和琥珀酸盐) 提供更大的稳定性 (图 6)。

[00126] SEC-HPLC 也用于评估包含 25 mg/ml 抗 - CD22, 在 pH 6.0、7.0、或 7.6 于琥珀酸盐、HEPES、或组合 (如上文说明的) 中, 在存在或不存在 75 mM NaCl 时, 在 -80°C、5 °C、或 40°C 储存 2 周的样品中高分子量种类的百分比。这些数据证明盐 (NaCl) 对这些样品中高分子量种类的形成没有显著的影响 (图 6)。因此, 盐的存在不是储存抗体的决定性条件。

实施例 2: pH/缓冲液

[00127] 为了测定在不同的 pH 下, 不同的缓冲液是否提供适宜的储存条件, 在超过和低于试验性“最适”pH 0.5 单位的 pH 下, 利用抗 - Lewis Y 抗体作为储存样品对缓冲液进行测试。在这些实验中, 在 5.0 至 6.0 pH 范围测试 4 个不同的缓冲系统。也评估各种离子强度对稳定性的影响。用于这些实验的缓冲液是 10 mM 乙酸钠, pH 5.0、5.5、和 6.0; 10 mM 乙酸钠, 75 mM NaCl, pH 5.0、5.5 和 6.0; 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.0、5.5、和 6.0; 10 mM 柠檬酸钠, 75 mM NaCl, pH 5.0、5.5 和 6.0; 10 mM 磷酸钠、pH 5.0、5.5、和 6.0; 10 mM 磷酸钠, 75 mM NaCl, pH 5.0、5.5、和 6.0; 10 mM 琥珀酸钠, pH 5.0、5.5、和 6.0; 和 10 mM 琥珀酸钠, 75 mM NaCl, pH 5.0、5.5、和 6.0。在这些实验中, 抗 - Lewis Y 经上述缓冲液透析并且稀释至终浓度为 1 mg/ml。然后样品储存在 -80°C 或 40°C 达到 4 周, 利用 SEC-HPLC 分析高分子量种类的百分比和低分子量种类的百分比。在这些实验中, 发现高分子量种类不是主要的降解物, 并且不同制剂之间高分子量种类水平的差异是可忽略的 (图 7A)。在 pH 5.5, 柠檬酸钠样品显示出所有缓冲液 (有或没有加入 NaCl) 当中低分子量种类的最低水平 (图 7B)。

[00128] 进一步利用 CEX-HPLC 分析样品。这些数据证实了来自 SEC-HPLC 数据的全面观察结果, 在全部的 4 个测试缓冲液中在更高的 pH 样品中存在酸性种类百分比的增加 (图 8), 即, 在 5.0 至 6.0 的 pH 范围对于所有的缓冲液存在酸性种类的上升趋势。

[00129] 这些数据显示, 总的来看, 5.0 至 6.0 的 pH 范围内, 抗 - Lewis Y 的稳定性在所有的 4 个测试缓冲液 (乙酸钠、柠檬酸盐、磷酸盐、和琥珀酸盐) 中是相似的。此外, 在加速的稳定性研究 (检查在 40℃ 的稳定性, 图 7B) 中, 最低数量的低分子量种类形成是在包含柠檬酸钠缓冲液的样品中。因此, 用于抗 - Lewis Y 的适宜缓冲液是 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5。这些数据也显示出鉴定用于储存蛋白质, 例如抗体的适宜制剂的方法。

实施例 3: 盐浓度和蛋白质浓度

[00130] 将盐浓度作为可能对储存制剂中的蛋白质稳定性有影响的参数进行了研究。在实施例 2 描述的加速降解方案中也评估了在低蛋白浓度下的储存稳定性。在这些实验中, 发现在 1mg/ml 的蛋白质浓度, 加入 NaCl 轻微促进低分子量种类的形成 (图 7B), 同时在所有的测试缓冲液中其抑制酸性种类的形成 (图 8)。

[00131] 用 CEX-HPLC 和 SEC-HPLC 评估抗 - Lewis Y 在含不同摩尔数 NaCl 的 10mM 柠檬酸钠 pH 5.5 条件下的稳定性。这些数据显示抗 - Lewis Y 在包含 0-150 mM NaCl 的 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中, 在 5℃ 和 80℃ 是稳定的 (图 9A)。加速降解显示, 在 30 mg/ml 的蛋白质浓度, NaCl 抑制酸性种类的出现 (图 9A), 但是提高低分子量种类的形成 (图 9C), 并且高分子量种类的形成在不同的条件下是相对稳定的 (图 9B), 这证实了来自包含 1 mg/ml 蛋白质的样品的观察结果 (图 7 和 8)。因此, 发现 75 mM NaCl 的盐浓度对于使整个的降解作用最小化是最有利的。

伴有摇动时的稳定性

[00132] 另一个可能影响蛋白质稳定性的条件是样品经历摇动的数量。因此, 当样品被摇动时需要储存制剂保持一定量的稳定性。进行实验来测试制剂中抗 - Lewis Y 在各种条件下并且伴有摇动培养时的稳定性。在这些实验中, 通过在室温下以 360 rpm 摇动 24 小时, 在存在或不存在 150 mM NaCl 的情况下, 对在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 的包含 1 mg/ml 或 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的制剂进行了测定, 并且利用 SEC-HPLC 分析单体回收的百分比。

[00133] 这些实验证明当 30 mg/ml 浓度存在时, 当经受摇动时, 抗体是稳定的 (图 10)。也发现在 1 mg/ml, NaCl 稍微减少单体的回

收。

[00134] 因此, 相对于摇动对样品导致的应力, 简单的储存制剂可能提供足够的保护。

在冷冻/融化下的稳定性

[00135] 用于各种生产方法的蛋白质可能必须经受冻融循环, 实际上有时必须经受多个冻融循环。因此对于储存制剂适宜的是提供由冻融循环所引起最小降解作用的条件。此外, 它对确定何种冻融条件对蛋白质提供的最适保存。为了测试这些参数, 制备在存在或不存在 150 mM NaCl 的, 在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 中包含 1 mg/ml 或 30 mg/ml 的抗 - Lewis Y 的样品。然后这些样品经受 10 个冻融循环, 伴随速冻/速融、速冻/慢融、慢冻/速融、或慢冻/慢融的条件。速冻通过将样品在液氮中冷冻来进行, 而慢冻通过将样品置于 -80°C 来进行。速融通过在 37°C 水浴中融化样品来进行, 而慢融通过将样品置于室温下来进行。然后利用 SEC-HPLC 评估每个样品中单体的数量。

[00136] 这些实验的结果显示抗 - Lewis Y 在高蛋白浓度 (30 mg/ml) 下是稳定的, 与冻/融条件或 NaCl 浓度无关 (图 11A 和图 11B)。抗 - Lewis Y 在慢冻条件下是稳定的, 与蛋白质浓度、融化条件、或 NaCl 浓度无关。然而, 在 1 mg/ml, 制剂中的 NaCl 在速冻条件下回收量略微减少。

[00137] 鉴于以上所述, 可得出结论抗 - Lewis Y 在 -80°C 和 5°C, 在 0 mM-150 mM 的 NaCl 浓度范围中是稳定的。此外, 加速的稳定性研究 (在 40°C 的制剂研究) 显示 NaCl 略微降低酸性种类的形成, 同时促进低分子量种类的出现。鉴于这些结果, 发现 75 mM NaCl 最适于使抗 - Lewis Y 的整体降解作用最小化。

[00138] 这些实验也提供了鉴定特定蛋白质储存于上述的制剂中的适宜条件的方法。

抗-CD22

[00139] 为了检查储藏条件在不同蛋白质之间的可变性并且进一步验证用于鉴定特定蛋白质的储存制剂的方法, 对抗 - CD22 的储存稳定性进行了研究。在这些实验中, 用不同的缓冲液制备包含 25 mg/ml (图 6) 抗 - CD22 的制剂, 以获得所需要的 pH; 即 pH 6.0 (50 mM 琥珀酸盐); pH 7.0 (50 mM 琥珀酸盐和 50 mM HEPES); pH 7.6 (50 mM

HEPES), 并且在-80°C、5°C、25°C、或 40°C 储存 1 个月, 然后评估高分子量种类的百分比。。

[00140] 发现 NaCl 对高蛋白浓度抗 - CD22 在任何测试温度下的储存稳定性没有影响 (图 6 和图 12)。

在摇动应力下的稳定性

[00141] 进行摇动研究以在存在 NaCl 和聚山梨酸酯 80 的条件下, 测定对抗 - CD22 的表面/空气相互作用。也进行这个研究以评估抗 - CD22 作为液体在装运和配制期间的稳定性。在这些实验中, 制备在 pH 6.0 的 20 mM 琥珀酸盐缓冲液中包含 15 mg/ml 抗 - CD22 的样品, 其中, 再外加 75 mM NaCl, 0.1% 聚山梨酸酯 80, 或者 75 mM NaCl 和 0.1% 聚山梨酸酯 80 (Tween)。样品以 300 rpm 摇动 24 小时。同时制备在琥珀酸盐缓冲液中只包含抗 - CD22 的对照。然后分析高分子量种类的百分比。这些数据证明 NaCl 和聚山梨酸酯 80 均没有对摇动期间的抗 - CD22 稳定性表现出有益影响 (图 13)。

[00142] 总的来看, 上述有关储存制剂中抗 - CD22 的数据显示, NaCl 对抗 - CD22 的整体稳定性没有实质上的影响。因此, NaCl 在抗 - CD22 制剂中不是必需的。

实施例 4: 抗体浓度

[00143] 检查蛋白质浓度对制剂中储存稳定性的影响。当鉴定用于特定蛋白质的储存制剂时, 以及揭示与制剂中该参数重要性相关的一般原理时, 均需要测定合适的蛋白质浓度。

[00144] 在这些实验中, 制备在 pH 5.5 的 10 mM 柠檬酸盐中含 1 mg/ml 或 30 mg/ml 浓度的抗 - Lewis Y 的样品, 其中或不包含 NaCl、或包含 75 mM 的 NaCl。样品在 40°C 储存 4 周, 然后分析高分子量种类百分比的变化 (图 14A)、低分子量种类百分比的变化 (图 14B), 和酸性种类百分比的变化 (图 14C)。

[00145] 这些实验结果显示, 对包含 1 mg/ml 和 30 mg/ml 的制剂的稳定性而言, 具有更低浓度 (1 mg/ml) 只对 NaCl 的存在具有略微增加的敏感性。

[00146] 在储存制剂中持久的稳定性是特别需要的。因此, 进行研究以测定在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 和 75 mM NaCl 中包含 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 的 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 制剂在各种温度: -80°C、-20°C、

5°C、25°C、和 40°C 下的稳定性。在 1 个月、2 个月、3 个月、6 个月、和 9 个月测试样品的高分子量种类的百分比（图 15A），低分子量种类的百分比（图 15B），和酸性种类的百分比（图 15C）。这些数据的分析证明在 10 mM 柠檬酸钠，75 mM NaCl, pH5.5 制剂中，于 80°C 至 5°C 的温度范围储存 9 个月后存在抗 - Lewis Y 的良好蛋白质稳定性。

冻/融和摇动稳定性

[00147] 如上所示，（图 10 和图 11），看来抗 - Lewis Y 在 30 mg/ml 的浓度对摇动和冻/融应力不敏感。此外，抗 - Lewis Y 在 1 mg/ml 的浓度对慢冻不敏感，与融化速率无关。但是，在 1 mg/ml 抗 - Lewis Y 的浓度下，伴随摇动或被置于速冻条件下可发现蛋白质损失。

抗-CD22/冻/融

[00148] 为了进一步研究冻融循环的影响，在 pH 6.0 以及，任选包含聚山梨酸酯 80 (0.001%) 的 20 mM 琥珀酸盐中的、1 mg/ml 或 25 mg/ml 浓度的抗 - CD22 经受各种冻融方案，以及 0、1、5、或 10 个各方案的循环。方案是速冻/速融（FF/FT）、速冻/慢融（FF/ST）、慢冻/速融（SF/FT）、和慢冻/慢融（SF/ST）。然后分析 HMV 种类的百分比。

[00149] 这些数据显示 25 mg/ml 的抗 - CD22 对冻/融应力不敏感，与聚山梨酸酯 80 的存在与否无关（图 16B 和图 16D）。然而，在 1 mg/ml 的浓度，抗 - CD22 对速冻敏感（图 16A 和图 16C）。因此，对于这个抗体，如果样品经受冻融循环，应选择更高的储存浓度，尽管它不必包括表面活性剂。

储存稳定性

[00150] 图 5 和 6 显示实验结果证明抗 - CD22 在 -80°C 至 5°C, 0.5 mg/ml 和 30 mg/ml 是稳定的。在 40°C，高分子量种类的百分比在包含高蛋白浓度的样品中在储存 2 周后增加（图 6），同时在包含低蛋白浓度的样品中检测到高分子量种类的百分比无变化（图 5）。

实施例 5: 表面活性剂作用

[00151] 用于储存蛋白质样品的许多方案要求包括表面活性剂。因此研究在储存制剂中包括表面活性剂的必要性。在这些实验中，将任选地包含 0%、0.001%、0.005%、或 0.01% 聚山梨酸酯 80 的 10 mM 柠檬酸钠缓冲液中的、1 mg/ml 或 30 mg/ml 浓度的抗 - Lewis Y 抗体在室

温下以 360 rpm 摇动培养 24 小时。然后利用 SEC-HPLC 分析单体回收的百分比。

[00152] 当制剂中的蛋白质以 30 mg/ml 的较高浓度存在时, 数据显示聚山梨酸酯 80 不是必要的。在 1 mg/ml, 聚山梨酸酯 80 为抗 - Lewis Y 提供一些针对摇动应力的保护 (图 17A 和图 17B)。

冻/融稳定性

[00153] 检查聚山梨酸酯 80 对抗 - Lewis Y 在各种冻/融条件期间稳定性的影响。在这些实验中制备包含 1 mg/ml 或 30 mg/ml 抗 - Lewis Y 抗体的样品, 所用的缓冲液为 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5, 且其中或不包含聚山梨酸酯 80 或仅包含 0.01% 聚山梨酸酯 80。然后如上所述样品经受 10 个冻/融循环。

[00154] 在 30 mg/ml, 抗 - Lewis Y 对冻/融应力不敏感, 与表面活性剂的存在与否无关 (图 18B)。抗 - Lewis Y 在慢冻条件下也是稳定的, 与蛋白质浓度或融化条件无关 (图 18A 和图 18B)。聚山梨酸酯 80 在 30 mg/ml 的蛋白质浓度或如果使用慢冻则不影响结果。在包含 1 mg/ml 抗体的样品中, 聚山梨酸酯 80 在速冻条件下保护抗 - Lewis Y (图 18A)。

储存稳定性

[00155] 研究表面活性剂对抗 - Lewis Y 储存稳定性的影响。在这些实验中, 制备在 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.5 包含 30 mg/ml 的抗 - Lewis Y 的样品, 并且其中包含 75 mM NaCl。此外, 样品具有 0.001% 聚山梨酸酯 80 或没有聚山梨酸酯 80。样品培养在 -80°C、-20°C、5°C、25°C、或 40°C 1 个月、2 个月、3 个月、6 个月、或 9 个月, 并且如在此描述的分析高分子量种类的百分比、低分子量种类的百分比、和酸性种类的百分比。

[00156] 通常, 这些实验证明聚山梨酸酯 80 对抗 - Lewis Y 在测试条件的全部温度范围 -80°C 至 40°C 下的稳定性没有显著影响 (图 19A、19B 和 19C)。

[00157] 用抗 - Lewis Y 作试验的结果整体上证明在 30 mg/ml 的浓度, 抗 - Lewis Y 在摇动和冻/融应力条件下是稳定的。表面活性剂对影响这个稳定性不是必须的。在 1 mg/ml 的浓度, 抗 - Lewis 在慢冻条件下是稳定的。表面活性剂对影响这个条件不是必需的。此外, 在 1

mg/ml 的抗体浓度，聚山梨酸酯 80 保护抗 - Lewis Y 抵抗摇动和速冻诱导的变性，以及通常表面活性剂对储存期间蛋白质的稳定性没有显著影响。

[00158] 与抗 - Lewis Y 的结果相反，聚山梨酸酯 80 不完全保护抗 - CD22 抵抗摇动应力（图 13）。然而，如在图 16 的数据中表明的，在 25 mg/ml，抗 - CD22 在冻/融应力下是稳定的并且不需要表面活性剂。在 1 mg/ml，抗 - CD22 在慢冻条件下是稳定的并且不需要表面活性剂。表面活性剂只在速冻的条件下为抗 - CD22 提供额外保护。

[00159] 为了进一步研究表面活性剂对抗 - CD22 的影响，进行 6 个月的抗 - CD22 稳定性研究。在这些实验中，在 20 mM 琥珀酸盐，pH 6.0 (S)；20 mM 琥珀酸盐，10 mM 甲硫氨酸，pH 6.0 (SM)；20 mM 琥珀酸盐，0.01% 聚山梨酸酯 80，pH 6.0 (ST)；或 20 mM 琥珀酸盐，10 mM 甲硫氨酸，0.01% 聚山梨酸酯 80，pH 6.0 (SMT) 中制备 25 mg/ml 浓度的抗 - CD22；并且在 -80°C、-2-8°C、25°C、或 40°C 培养 6 个月。然后分析样品的高分子量种类的百分比、总峰面积的百分比（回收指标）、和完全活性种类的百分比。注意峰值 5 是完全活性种类。

[00160] 通常，没有参数显示对抗 - CD22 的稳定性有任何显著的影响（图 20A、图 20B、和图 20C）。

[00161] 2 个不同抗体（抗 - Lewis Y 和抗 - CD22）的短期储存数据和长期保存数据整体地都证明表面活性剂（聚山梨酸酯 80）不是为稳定在储存制剂中的抗体所必需的。

实施例 6：用于储存抗 - 5T4 的制剂

如测定用于储存蛋白质的制剂的另外实例，评估盐浓度、pH、蛋白质浓度和缓冲液类型和浓度的参数用于储存针对 5T4 的抗体。

pH

[00162] 为了鉴定用于储存抗 - 5T4 抗体制剂的适宜 pH，在 pH 4.0 至 pH 8.0 的 pH 范围测试包含 1mg/ml 抗 - 5T4 的样品。样品透析入各 pH 缓冲液来制备。用于这些实验的全部制剂使用有或没有 150 mM NaCl 的 10 mM 磷酸钠缓冲液。无菌过滤制剂中的蛋白质并且置于 -80°C 冰箱，或置于维持在 5°C、25°C、或 40°C 的稳定室内。然后分析样品中高分子量种类（HMW）的存在（图 21）。

[00163] 发现抗 - 5T4 在缺少 NaCl 时，在 5°C、25°C、和 40°C，

在全部的 pH 范围, 当在 10 mM 磷酸钠缓冲液中时, 具有最低数量的高分子量种类。抗体在包含 NaCl 的制剂中, 在 pH 7, 以及在 pH 8 使用磷酸钠作为缓冲液, 对于冻/融循环不是稳定的。也观察到在 pH 4, 具有 150 mM NaCl 时, 在 40°C 蛋白质是不稳定的。

[00164] 对制备并且储存在各种 pH (如上所述) 以及在 40°C 储存 2 周的样品进行等电聚焦 (IEF)。发现保存在 pH 4 (没有 NaCl) 和 pH 5 以及 pH 6 (有或没有 NaCl) 的制剂中的样品显示最小数量的整体蛋白质电荷变化。

[00165] 对在 40°C 储存 2 周的抗 - 5T4 pH 筛选样品进行 SDS-PAGE 分析。pH 5.0 至 pH 7.0 的 pH 范围中的样品在非还原的凝胶中显示最小数量的高分子量种类并且与还原凝胶中的起始材料相比显示最小数量的蛋白质分子量变化。

[00166] 这些数据证明抗 - 5T4 在 10 mM 磷酸钠中, 在存在或不存在 NaCl 时, 在 -80°C、5°C、和 25°C, 在 pH 4.0 至 pH 7.0 的 pH 范围是稳定的。根据 pH 筛选的加速结果 (即, 在高温获得的结果), pH 5 至 pH 6 优选为抗 - 5T4 稳定性的适宜 pH 范围。

缓冲液

[00167] 测试 4 个不同缓冲系统中抗 - 5T4 在制剂中, 在 5.0 至 7.0 pH 范围的稳定储存。也评估离子强度对稳定性的影响。使用的这些缓冲系统是 10 mM 乙酸钠, pH 5.0; 10 mM 乙酸钠 5.5; 10 mM 乙酸钠, 150 mM NaCl, pH 5.0; 10 mM 乙酸钠, 150 mM NaCl, pH 5.5; 10 mM 柠檬酸钠, pH 5.0; 10 mM 柠檬酸钠 pH 5.5, 10 mM 柠檬酸钠, pH 6.0; 10 mM 柠檬酸钠, 150 mM NaCl, pH 5.0; 10 mM 柠檬酸钠, 150 mM NaCl, pH 5.5; 10 mM 柠檬酸钠, 150 mM NaCl, pH 6.0; 10 mM 磷酸钠, pH 6.0; 10 mM 磷酸钠, pH 6.5; 10 mM 磷酸钠, pH 7.0; 10 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, pH 6.0; 10 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, pH 6.5; 10 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, pH 7.0; 10 mM 琥珀酸钠, pH 5.0;

10 mM 琥珀酸钠, 5.5; 10 mM 琥珀酸钠, pH 6.0; 10 mM 琥珀酸钠, pH 6.5; 10 mM 琥珀酸钠, 150 mM NaCl, pH 5.0; 10 mM 琥珀酸钠, 150 mM NaCl, pH 5.5; 10 mM 琥珀酸钠, 150 mM NaCl, pH 6.0; 和 10 mM 琥珀酸钠, 150 mM NaCl, pH 6.5。

[00168] 透析抗 - 5T4 进入上述缓冲液并且稀释至终浓度为 2

mg/ml。样品储存在 -80°C 和 40°C 达到4周，然后利用起始样品（在储存前）和储存4周后样品的SEC-HPLC分析。在这些数据中（图22），发现高分子量种类不是主要的降解产物并且在储存4周后各个制剂中高分子量种类的百分比相当于，或小于存在于起始样品中存在的高分子量种类的百分比。在大多数包含NaCl的制剂中低分子量种类是升高的。

[00169] 进行热熔化(T_m s)以评估在各种制剂中的储存对蛋白质(抗-5T4)热稳定性的影响。使用差示扫描量热法(DSC)产生了热图。这种热图的实例显示在图23A)中。差示扫描量热法的结果在图23B中举例说明。

[00170] 当该制剂使用柠檬酸盐或琥珀酸盐作为缓冲液时，在pH 5.0的制剂中的蛋白质是最少热稳定的。发现NaCl是热不稳定的，因为在各个pH/缓冲液条件的 T_m 值与其相应的无NaCl制剂相比是更低的。在乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、和磷酸盐缓冲液中5.5至7.0 pH范围内的所有其他制剂显示最高的 T_m s并因此显示最高的热稳定性。

[00171] CEX-HPLC也用于分析抗-5T4的稳定性。在这些研究中，对在 40°C 储存4周后的样品进行CEX-HPLC。这些结果在图25中举例说明，并且证明对于全部的4个测试缓冲液，在较高pH，酸性种类百分比增加，碱性种类百分比减少。包含NaCl的一些制剂比相应的无NaCl的制剂具有较高水平的酸性种类和较低水平的碱性种类。

[00172] 为了进一步分析各种制剂的稳定性，对在 40°C 储存4周后的样品进行还原SDS-PAGE。这些样品的分析证明储存在pH 5.5和pH 6.0的制剂中的样品与还原凝胶中的起始材料相比保持最小量的蛋白质分子量变化。

[00173] 通常，这些数据证明用于这些实验的抗-5T4蛋白质在所有的4个测试缓冲液（乙酸钠、柠檬酸盐、磷酸盐、和琥珀酸盐）中，当储存在pH 5.5-6.5的pH时，具有相似的稳定性。加速稳定性研究显示最小量的低分子量种类在不包含NaCl的制剂中形成。

盐(NaCl)的影响

[00174] 如上面例证说明的，抗-5T4在10 mM磷酸钠中，在pH 5-6的制剂中，在 -80°C 、 5°C 、和 25°C ，在150 mM NaCl中是稳定的。然而，NaCl不提高稳定性，因此不对稳定性提供有益影响（图21）。

[00175] 在 40℃ 的加速稳定性研究结果证明 NaCl 促进高分子量和低分子量形成以及抗体热稳定性的降低 (图 22、图 24A、图 24B、和图 25)。

抗体浓度

[00176] 检查抗体 (蛋白质) 浓度对储存稳定性的影响。在这些实验中, 再次利用狭窄的 pH 范围; 5.5 至 6.5 测试乙酸钠、柠檬酸钠、和琥珀酸钠缓冲系统。透析抗 - 5T4 进入缓冲液并且稀释至终浓度为 2 mg/ml。制备附加组的样品, 在柠檬酸盐或琥珀酸盐中的浓度为 30mg/ml。样品在 -80°C 和 40°C 储存达到 6 周, 然后进行分析。图 26A 和图 26B 例证说明这些样品的 SEC-HPLC 分析结果。通常, 这些数据证明对于 2 mg/ml 和 30 mg/ml 制剂观察到类似的稳定性, 尽管在 40°C 6 周后高蛋白浓度聚集了稍微更大量的高分子量种类。

[00177] 也在 40°C 储存 6 周后对这些样品进行 CEX-HPLC。对于包含 2 mg/ml 或 30 mg/ml 的 pH 5.5 制剂观察到类似的稳定性, 尽管在 2 mg/ml 的 pH 5.5 样品在 40°C 储存 6 周后具有稍微降低的酸性种类百分比 (图 27A 和 27B)。

[00178] 毛细管电泳 SDS (ceSDS; SDS-PAGE 等价法) 也用于分析在 40°C 储存 6 周的 2 mg/ml 样品。在这些实验中, 对于 2 mg/ml 样品观察到非常类似的稳定性, 其中 pH 5.5 样品显示稍微较少变化的蛋白质分子量。对于 2 mg/ml 样品观察到类似的稳定性, 其中 pH 5.5 样品通过毛细管电泳 SDS 方法 (SDS-PAGE 等价法) 显示稍微较少变化的蛋白质 MW (图 28)。

冻/融和摇动稳定性

[00179] 在蛋白质稳定性研究中, 在冻/融和摇动研究, pH 5.5, 存在或缺少 0.005% 植物衍生的聚山梨酸酯 80 和 3% 蔗糖的条件下测试乙酸钠、柠檬酸钠、和琥珀酸钠缓冲系统。在这些实验中, 抗 - 5T4 被透析入缓冲液并且稀释至终浓度为 25 mg/ml 和 1 mg/ml。样品在液氮中冷冻 (约 -196°C 或在 -80°C, 然后在 37°C 或在环境温度下融化。单独组的样品在 200 rpm, 20°C 摇动 24 小时。

[00180] 冻/融循环后通过测量在 A₄₀₀ 的吸光率来分析混浊度, 并且测定 1 mg/ml 样品的高分子量种类百分比。1 个冻/融循环后, 1 mg/ml 的抗 - 5T4 对慢冻 (SF) 条件 (80) 稍微敏感并且对速冻 (FF) 条件

(液氮)非常敏感。聚山梨酸酯 80 使 1 mg/ml 样品中的混浊度最小化并且高分子量种类的百分比增加。蔗糖改善(最小化)混浊度并且在存在蔗糖时,高分子量种类的百分比只在速冻条件下增加(图 29A 和图 29B)。

[00181] 也在多个(10个)冻/融循环后利用 25 mg/ml 蛋白质(抗-5T4)浓度的样品来分析混浊度和高分子量种类的百分比。(图 30A 和图 30B)。这些数据证明抗-5T4 在 25 mg/ml 的浓度对冻/融应力不敏感。10 个冻/融循环后加入聚山梨酸酯 80 和/或蔗糖只有混浊度和高分子量种类百分比的轻微减少。混浊度结果也证明没有益处,并且有时候当蔗糖被加入制剂时,它对抗-5T4 的稳定性是有害的。在制剂中使用乙酸盐缓冲液导致在大多数冻/融条件下混浊度的轻微降低和高分子量种类的较低百分比。

[00182] 利用包含 25 mg/ml 抗-5T4 的制剂,通过测量混浊度(A_{400})和高分子量种类的百分比分析在摇动条件下的稳定性。图 31A 和图 31B 例证说明了各种制剂中样品混浊度测定的结果。这些数据证明当在包含柠檬酸盐缓冲液的制剂中时,抗-5T4 对摇动应力非常敏感。对于 1 mg/ml 和 25 mg/ml 样品,加入聚山梨酸酯 80 的一些制剂存在混浊度和高分子量种类百分比的减少,但是向制剂加入蔗糖没有益处。乙酸盐缓冲液制剂通常显示最低的混浊度。

表面活性剂和防冻剂

[00183] 上文描述的一些实验(例如在图 29A、图 29B、图 30A、图 30B、图 31A、和图 31B 中例证说明的)包括其中该制剂包括表面活性剂(聚山梨酸酯 80)和/或防冻剂(蔗糖)的数据。就冷冻后的稳定性而言,包含 25 mg/ml 抗-5T4 的样品对冻/融应力不敏感。抗-5T4 在慢冻条件下也是稳定的,与蛋白质浓度或融化条件无关。聚山梨酸酯 80 不是当应用速融方案时,为提高 25 mg/ml 蛋白质浓度样品的稳定性所必需的。

[00184] 向制剂加入蔗糖不提高包含 25 mg/ml 抗-5T4 的那些样品的稳定性。对于包含 1 mg/ml 的样品,聚山梨酸酯 80 和蔗糖保护冻/融期间,特别是在速冻条件下的抗-5T4(图 29A 和图 29B 和图 30A 和图 30B)。

[00185] 也检查抗-5T4 在各种制剂中,在摇动条件下的稳定性。

当该蛋白质以极其高的 rpm 摇动时，聚山梨酸酯 80 促进蛋白质浓度为 25 mg/ml 的抗 - 5T4 制剂的混浊度最小化和高分子量种类百分比的最小化。在包含 1 mg/ml 抗 - 5T4 的制剂中，聚山梨酸酯 80 保护该蛋白质抵抗摇动应力（图 31A 和图 31B）。

[00186] 这些数据证明对于高蛋白浓度（例如，25 mg/ml），抗 - 5T4 在冻/融应力下是稳定的。在大多数冻/融条件下向制剂加入表面活性剂，特别是在包含乙酸盐缓冲液的制剂中，几乎没有益处。此外，在该制剂中不必使用防冻剂（例如蔗糖）。聚山梨酸酯 80 对于在剧烈摇动的条件下稳定抗 - 5T4 有用。

[00187] 此外，发现包含低蛋白浓度的样品（例如，1 mg/ml 抗 - 5T4）在慢冻条件下是稳定的。在这种低蛋白样品中，聚山梨酸酯 80 和蔗糖保护蛋白质（抗 - 5T4）抵抗冻/融-诱导的变性。在低蛋白浓度的样品中，聚山梨酸酯 80 也保护该蛋白质抵抗摇动-诱导的变性。

其他实施方案

[00188] 将理解已经结合其详细说明描述了本发明，上述说明书是用来举例说明而非限制由所附权利要求的范围定义的本发明范围。其他的方面、优点、和改变在下列权利要求的范围之内。

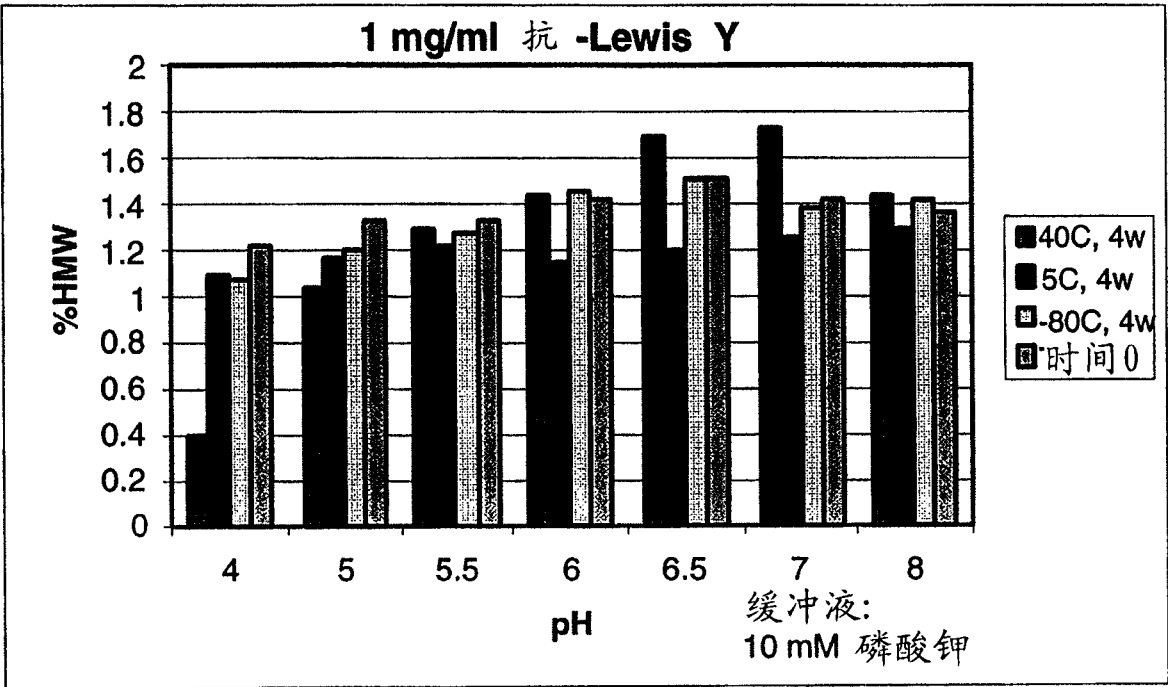


图 1A

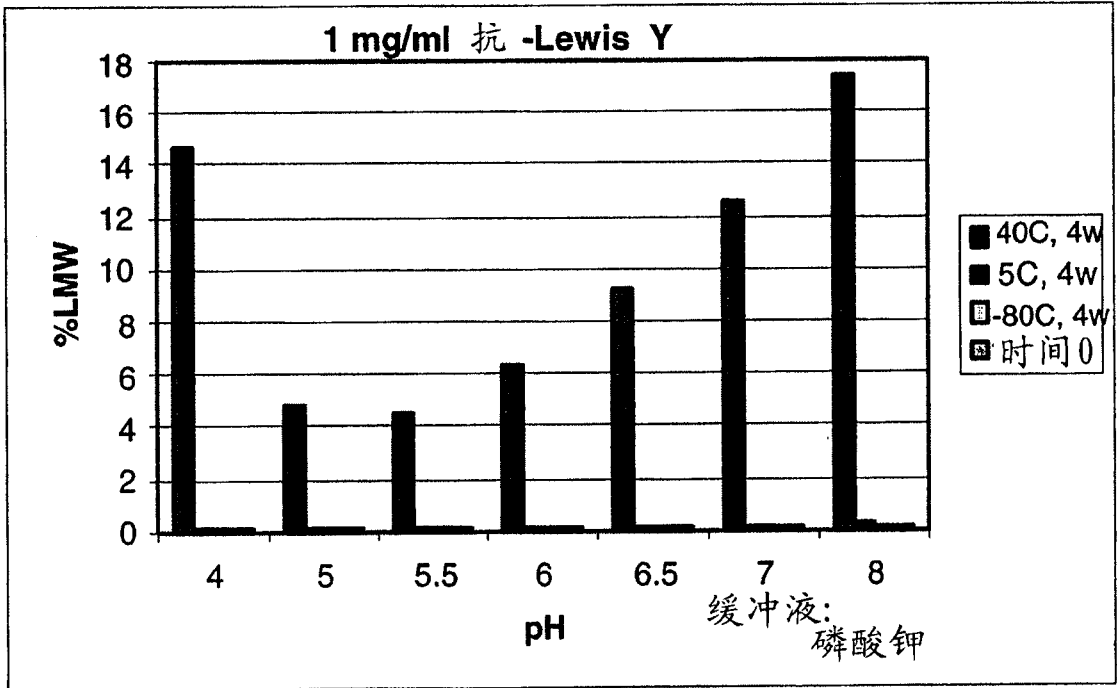


图 1B

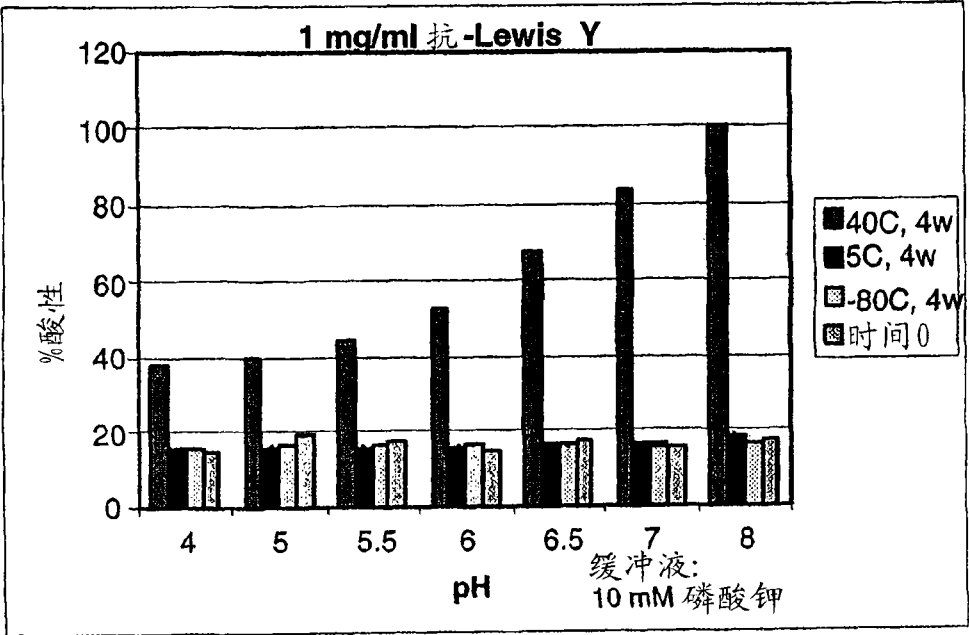


图 2

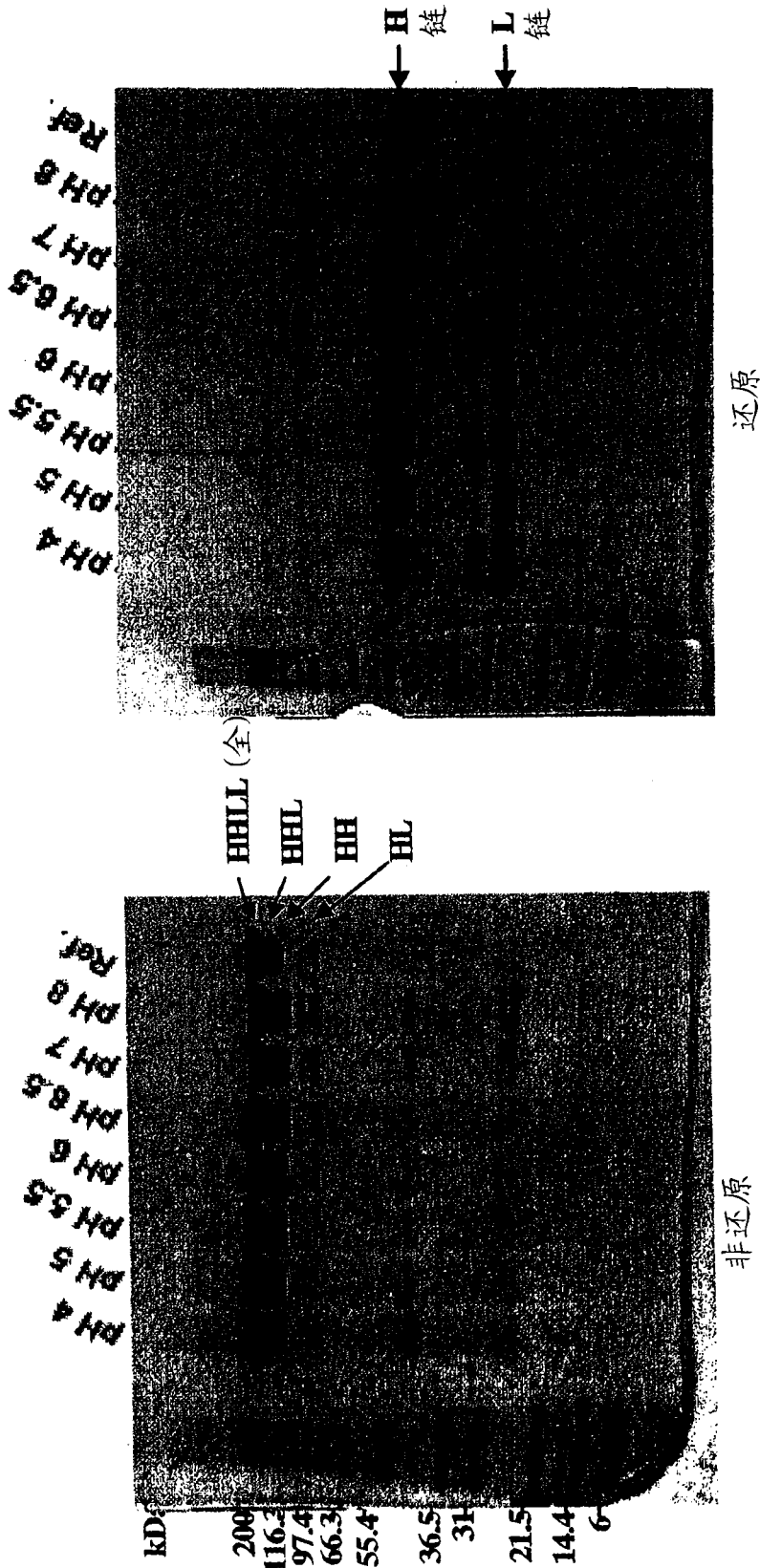


图 3

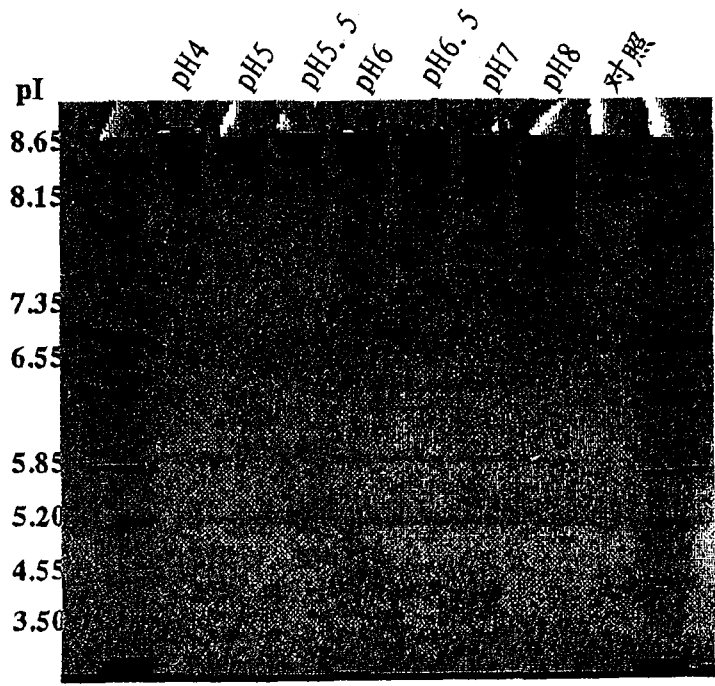


图 4

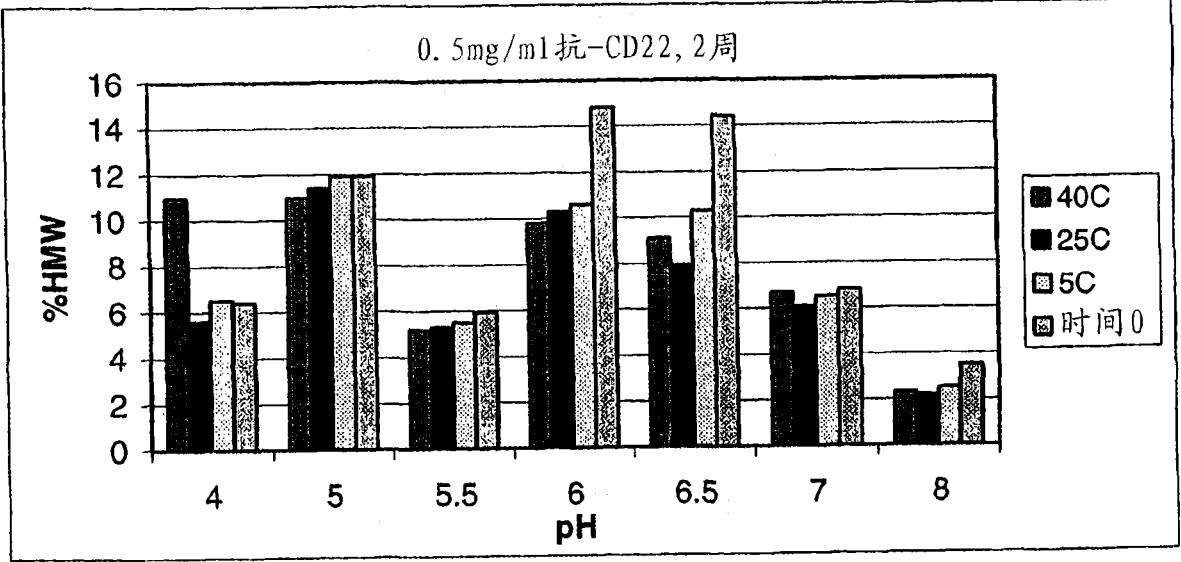
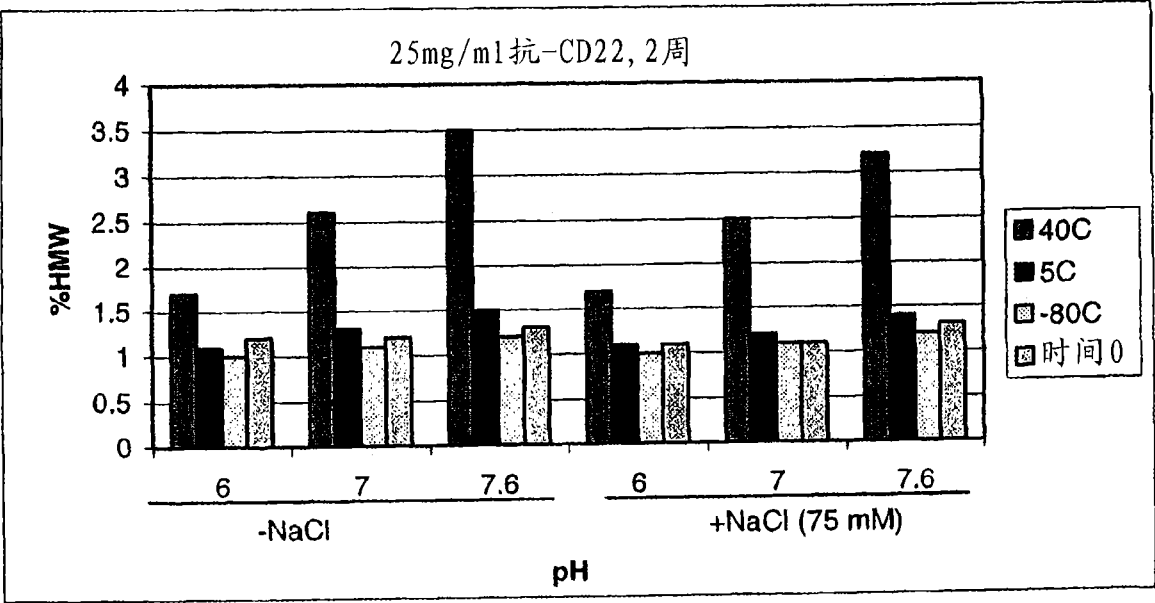


图 5



缓冲液:
pH6: 50 mM 琥珀酸盐
pH7: 50 mM 琥珀酸盐 50
mM HEPES

图 6

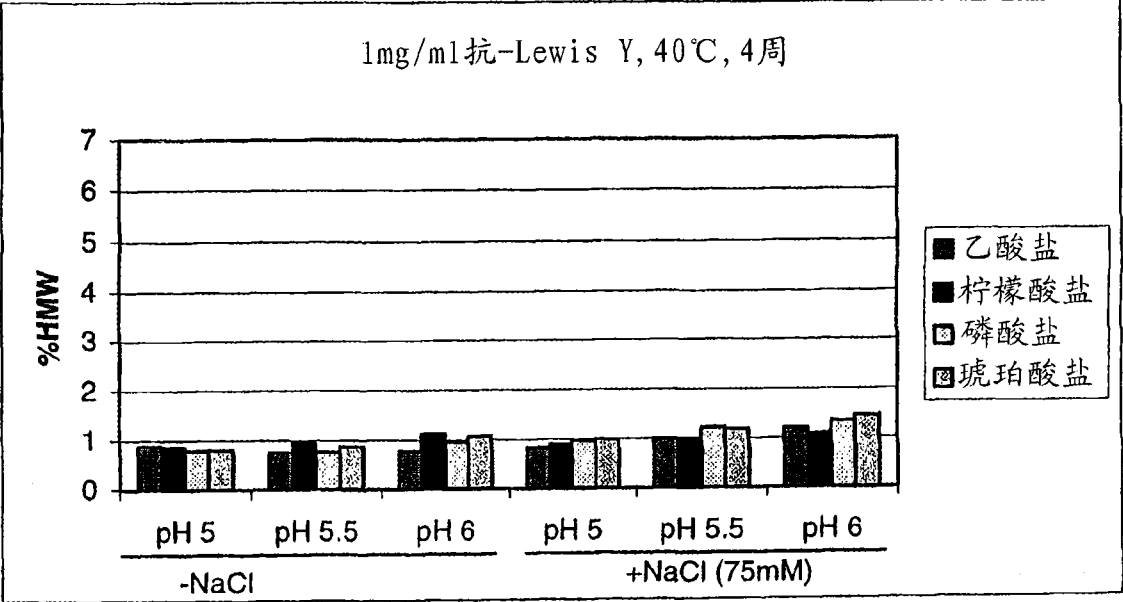


图 7A

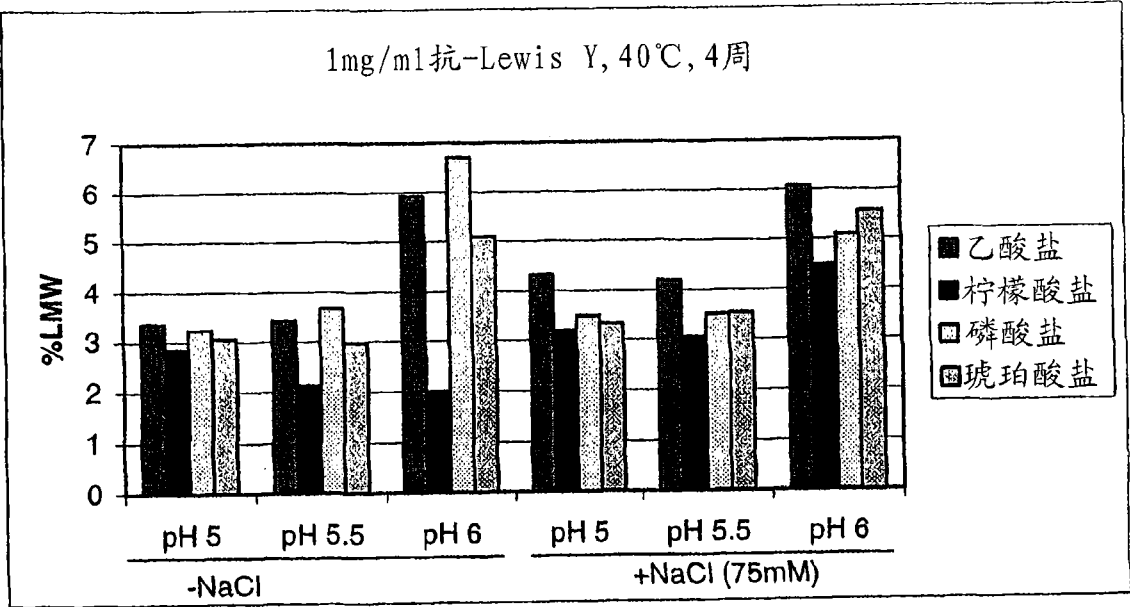


图 7B

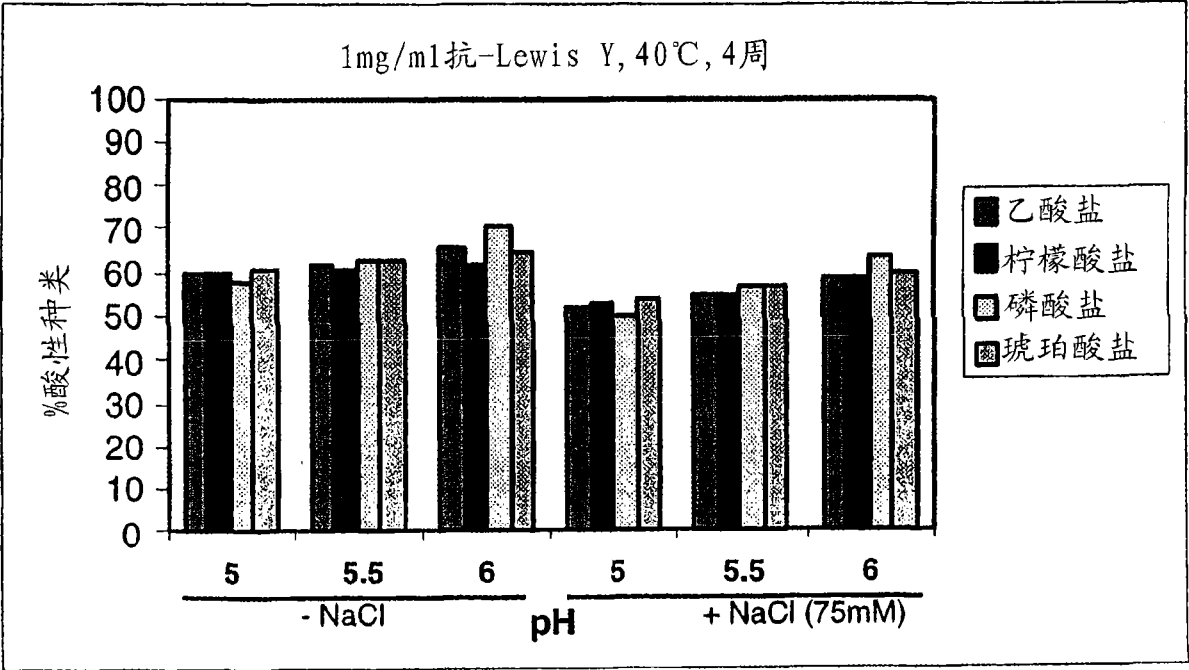


图 8

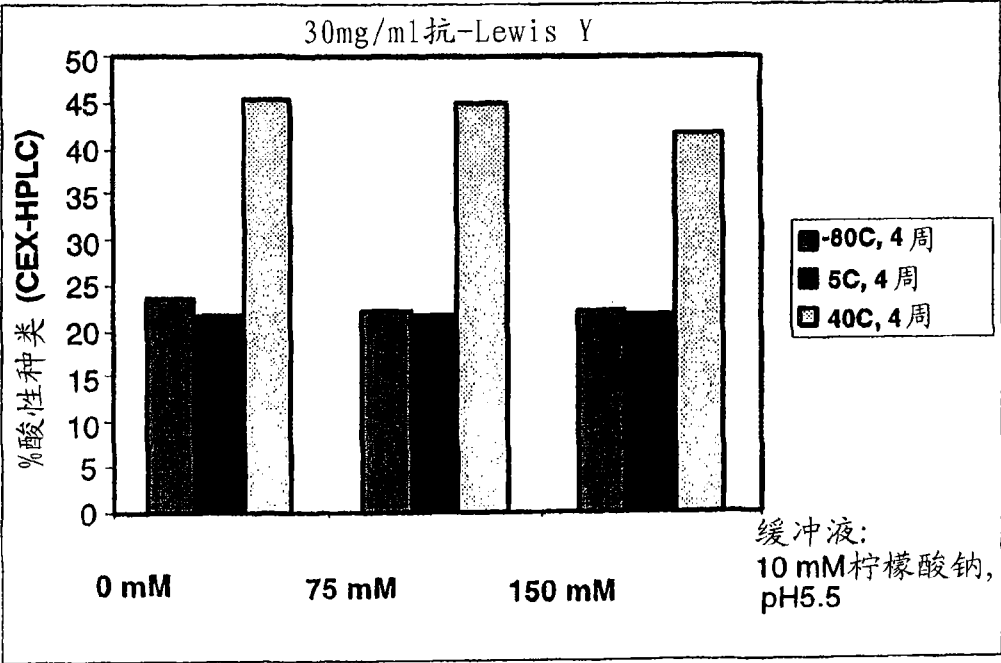


图 9A

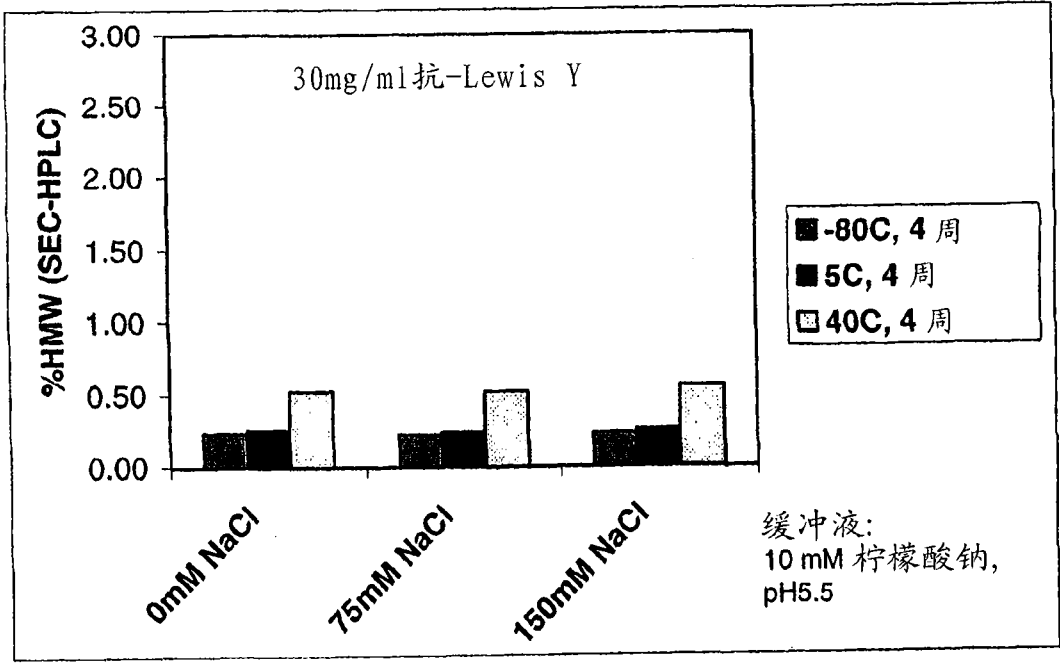


图 9B

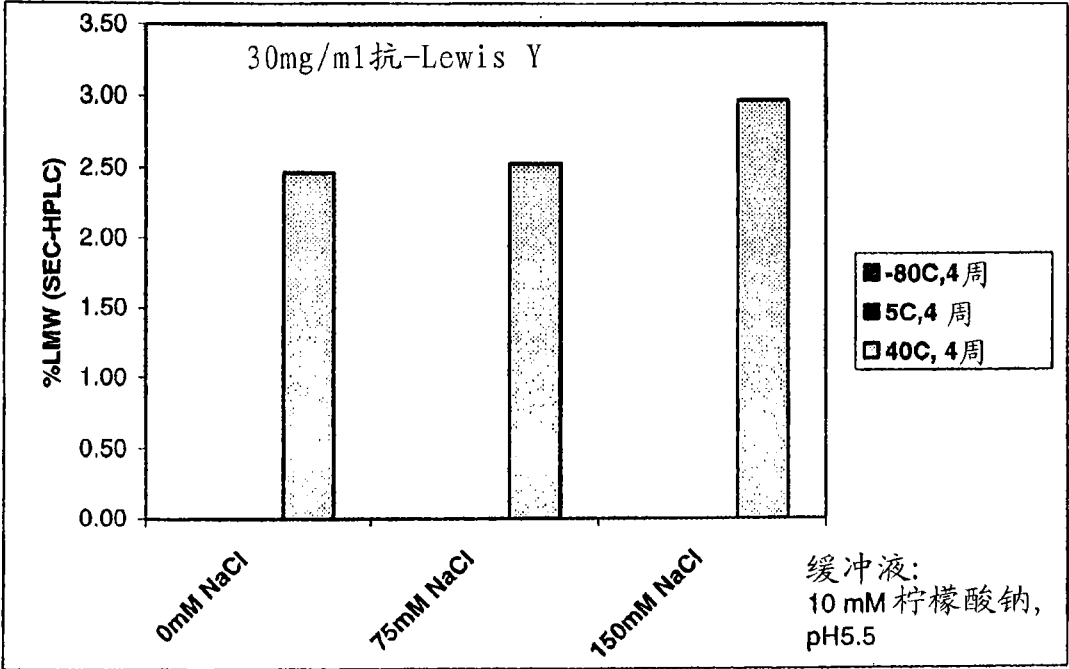


图 9C

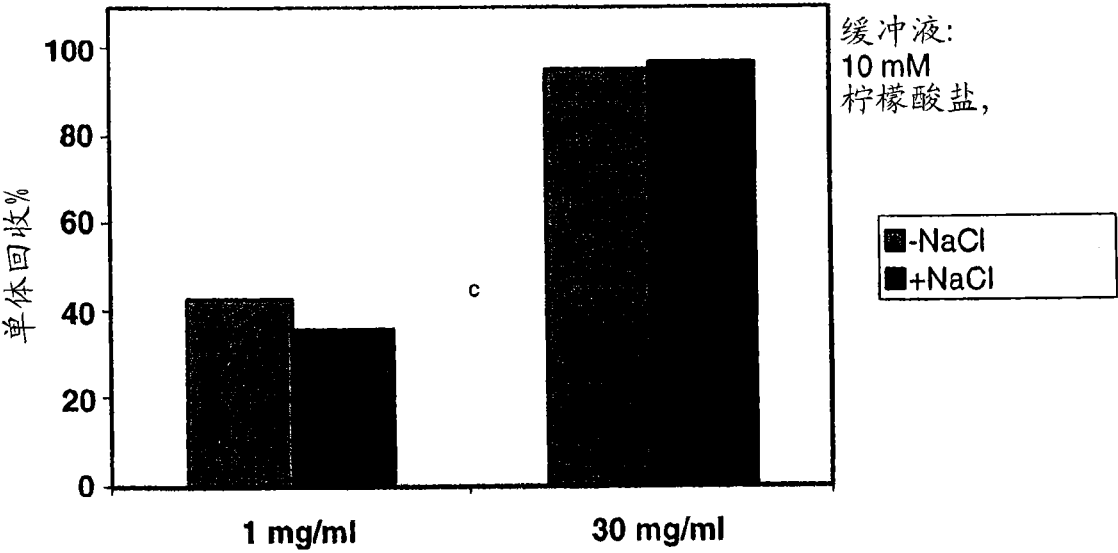


图 10

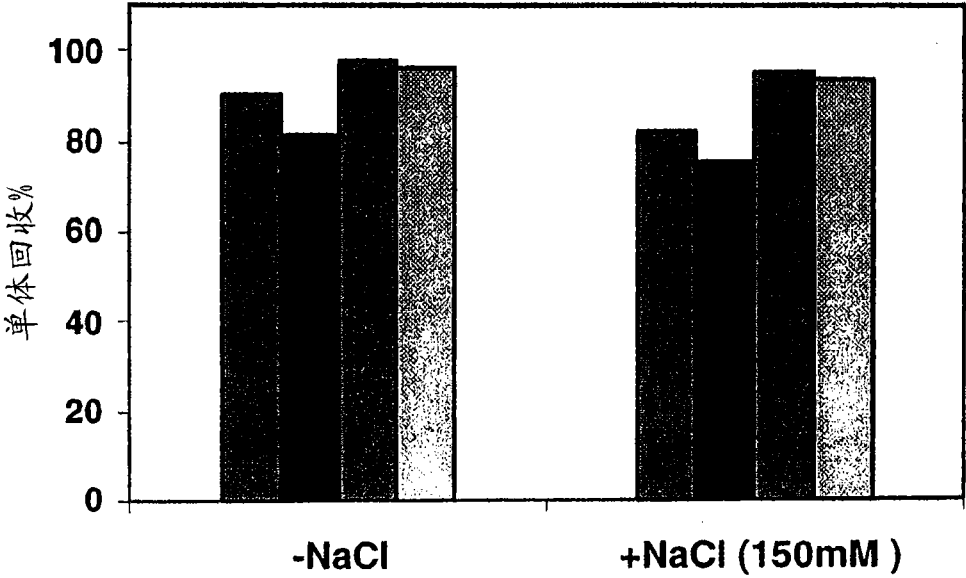


图 11A

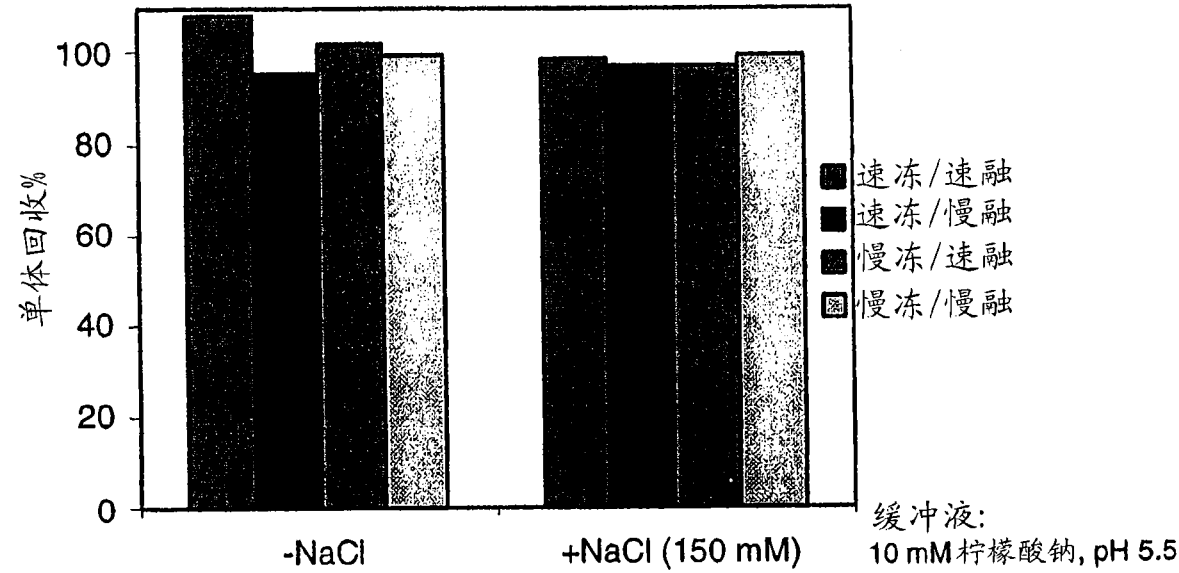


图 11B

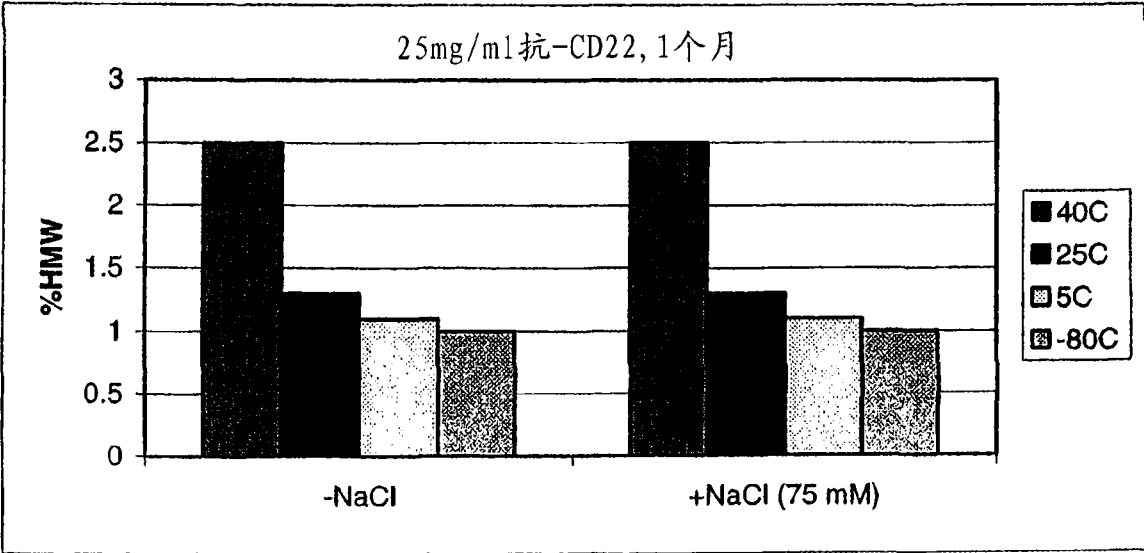


图 12

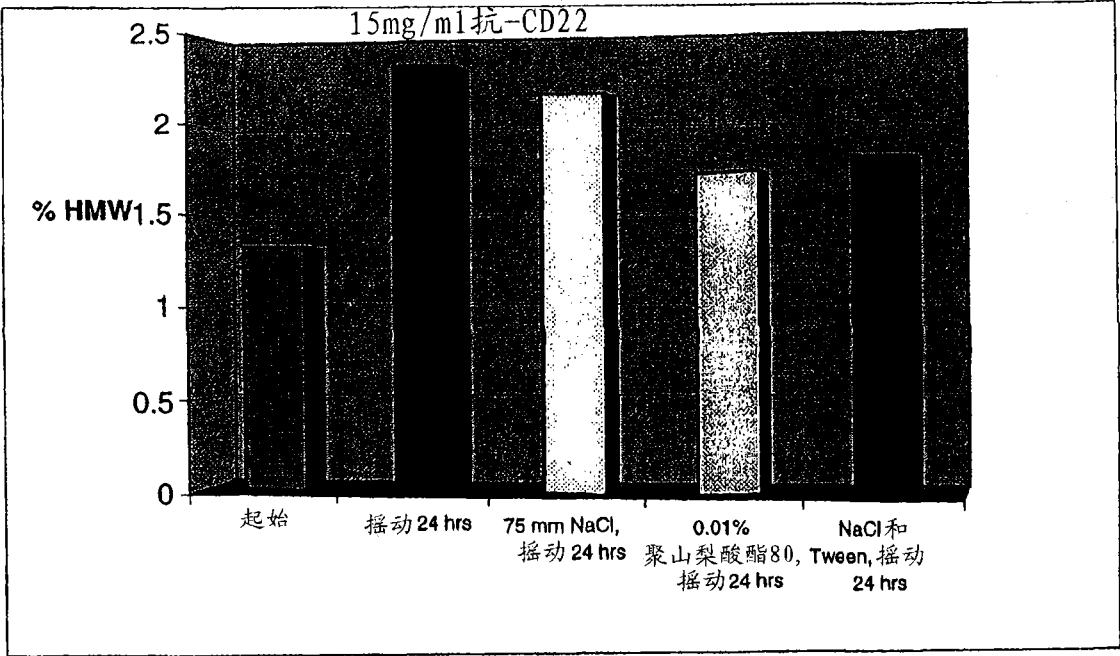


图 13

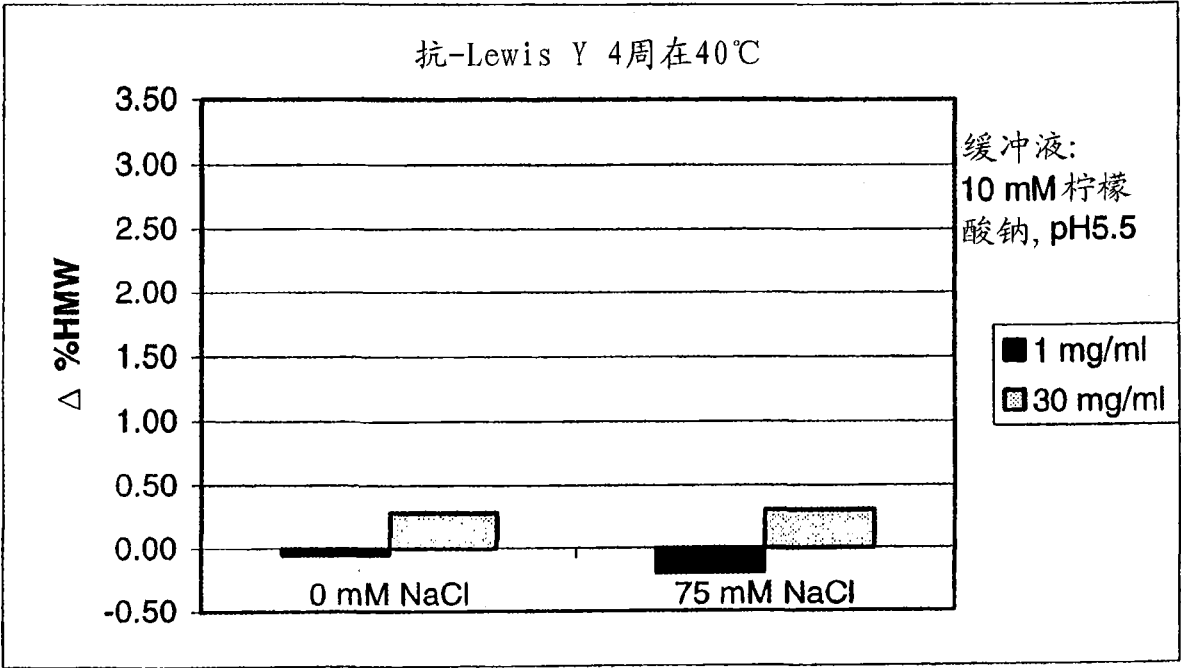


图 14A

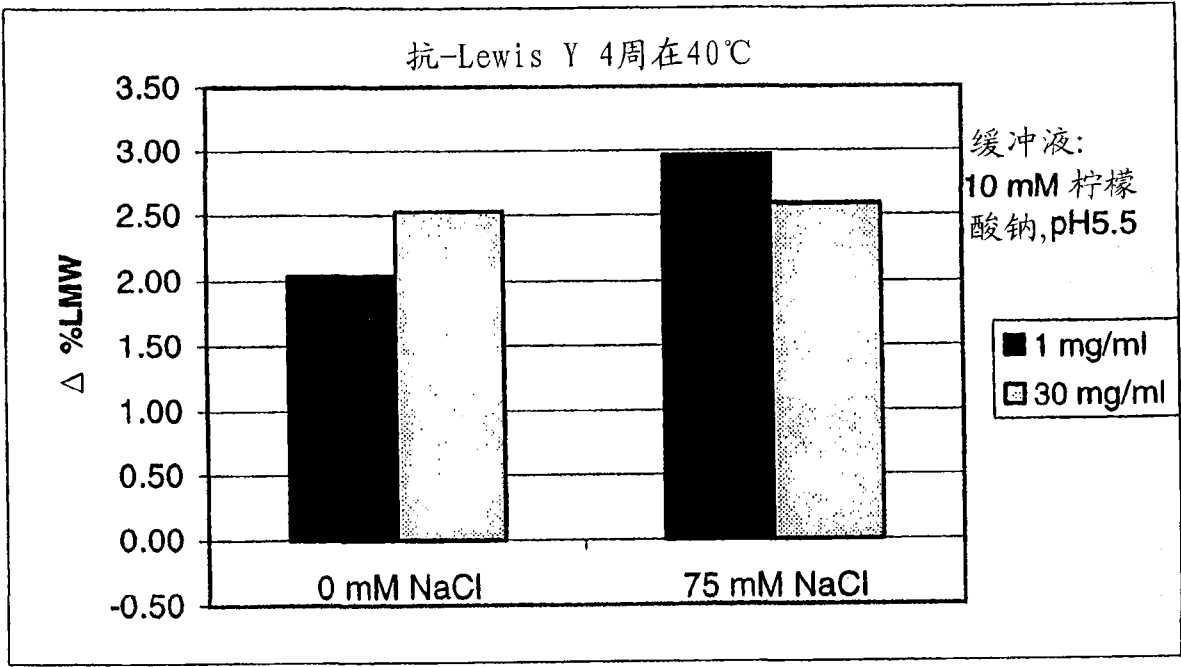


图 14B

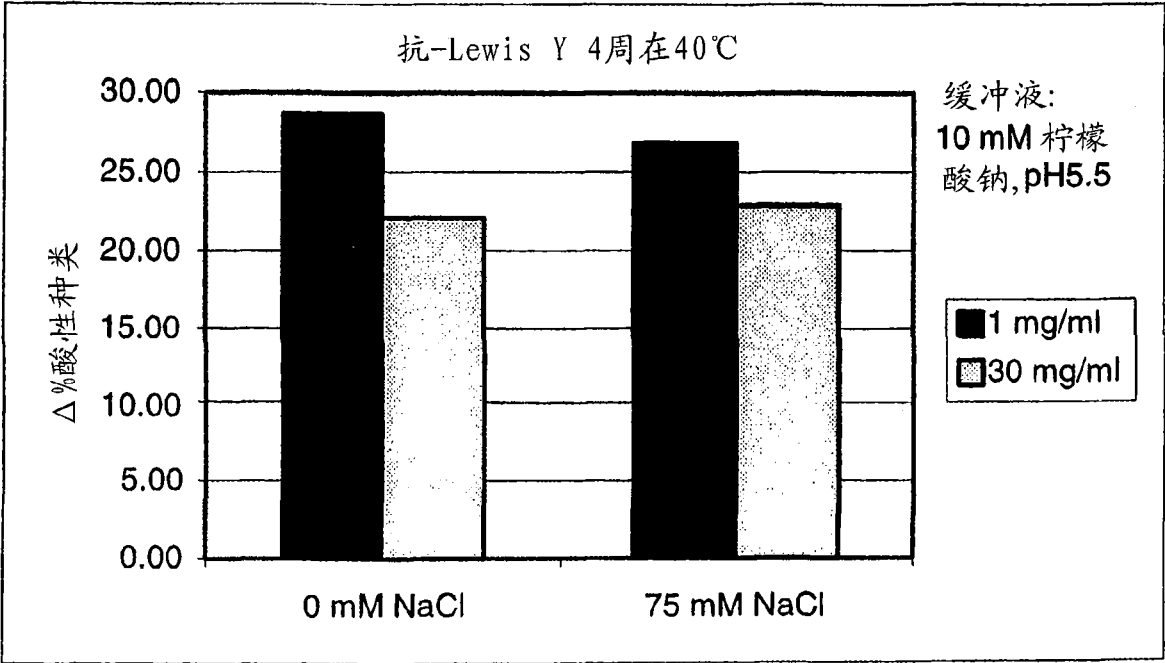


图 14C

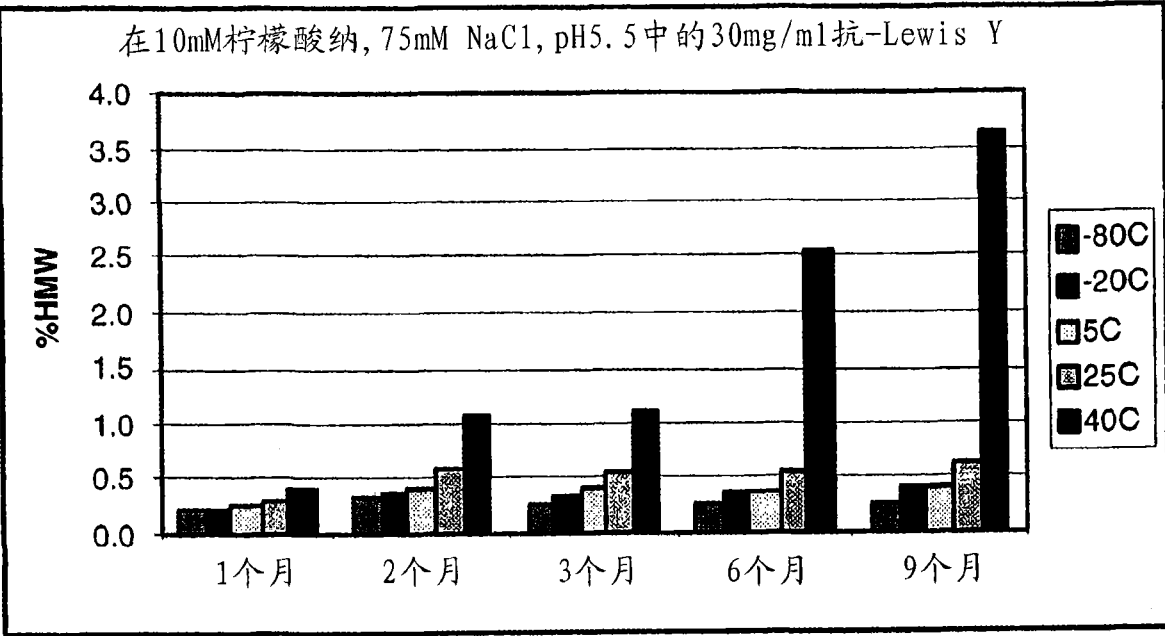


图 15A

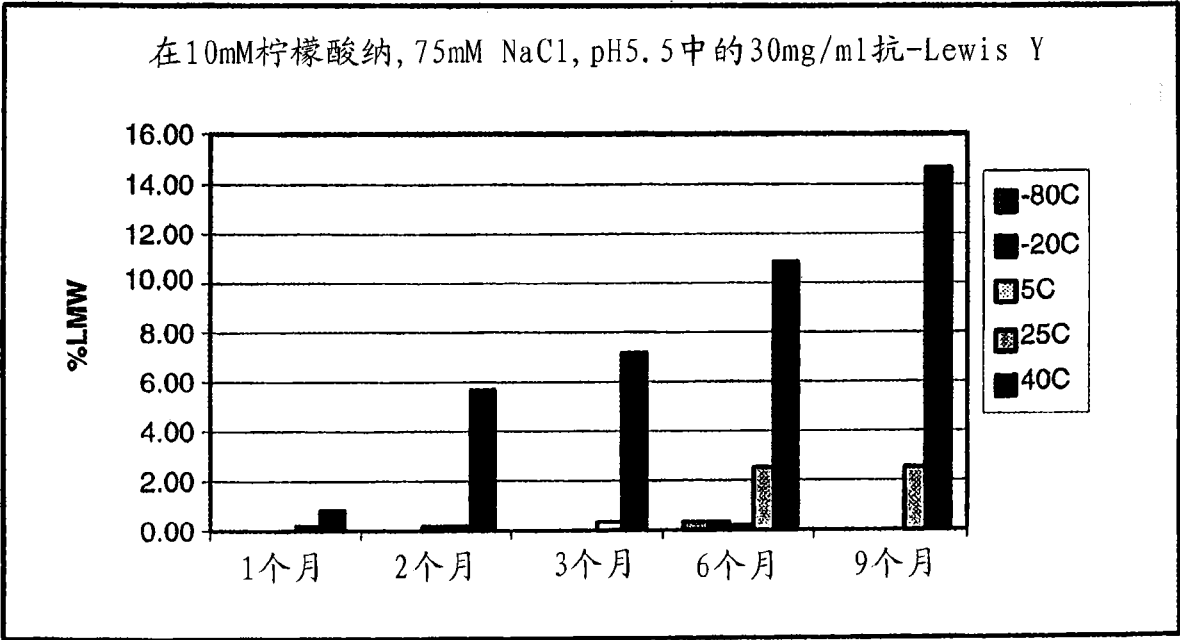


图 15B

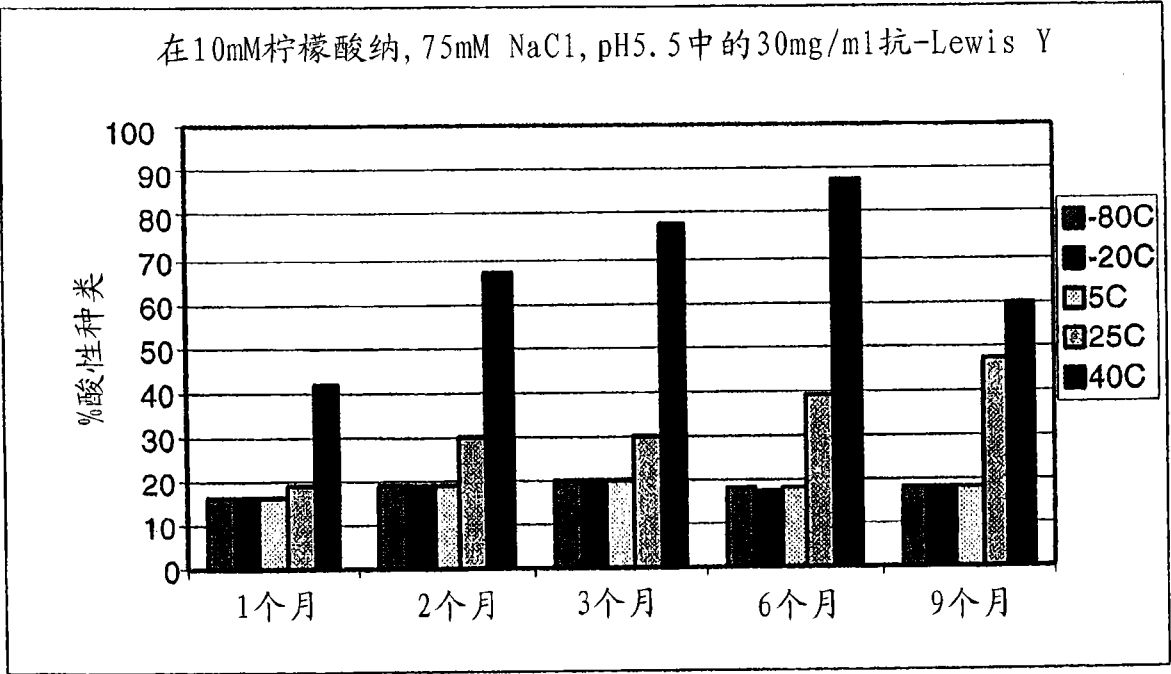


图 15C

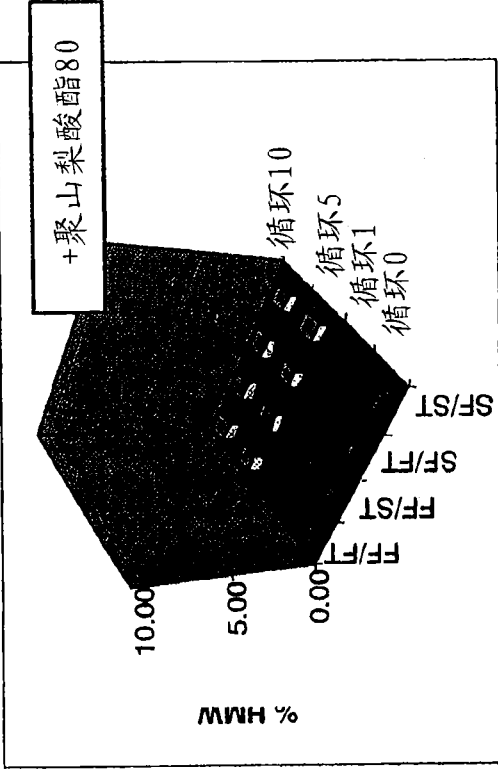
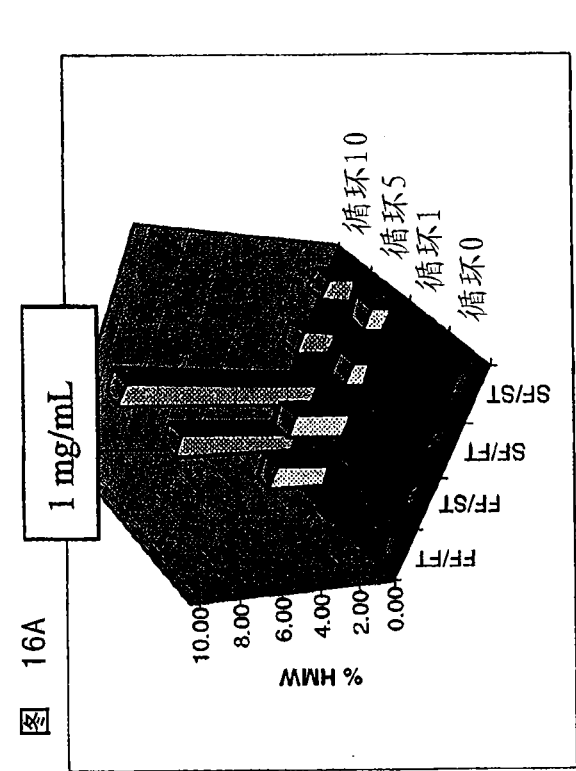
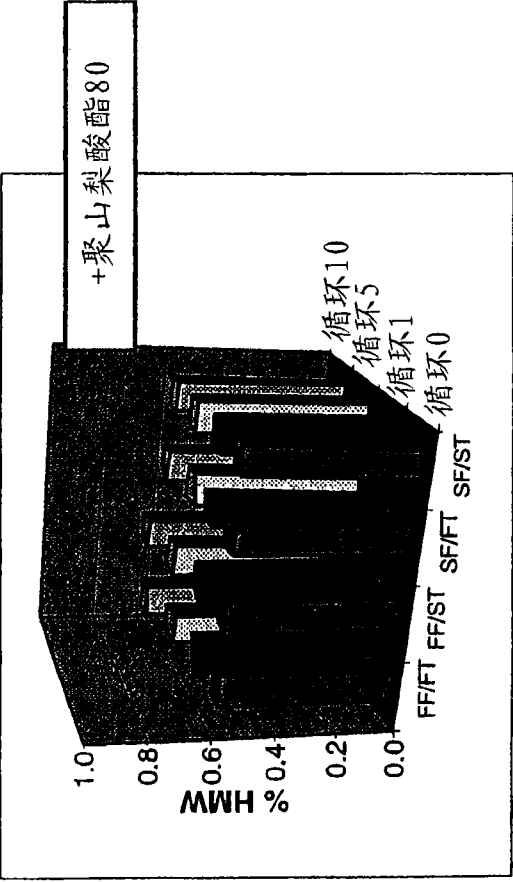
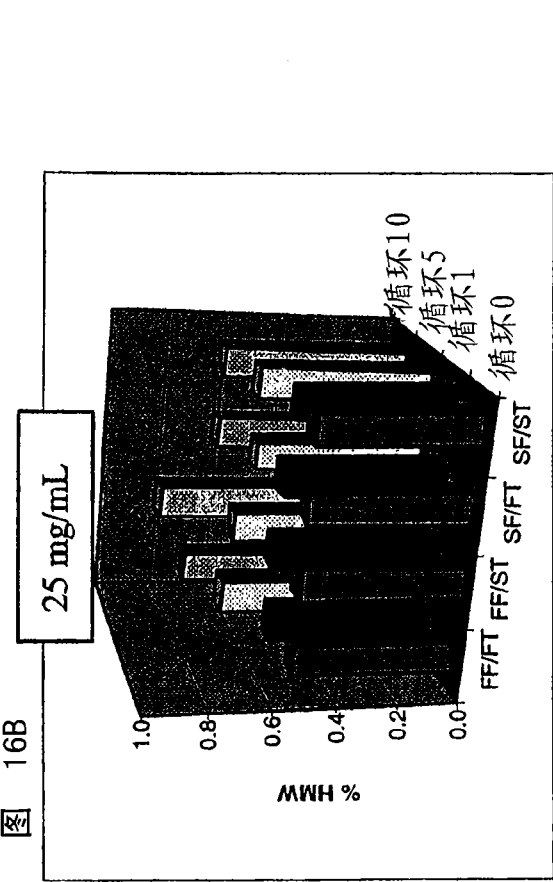


图 16D

图 16C

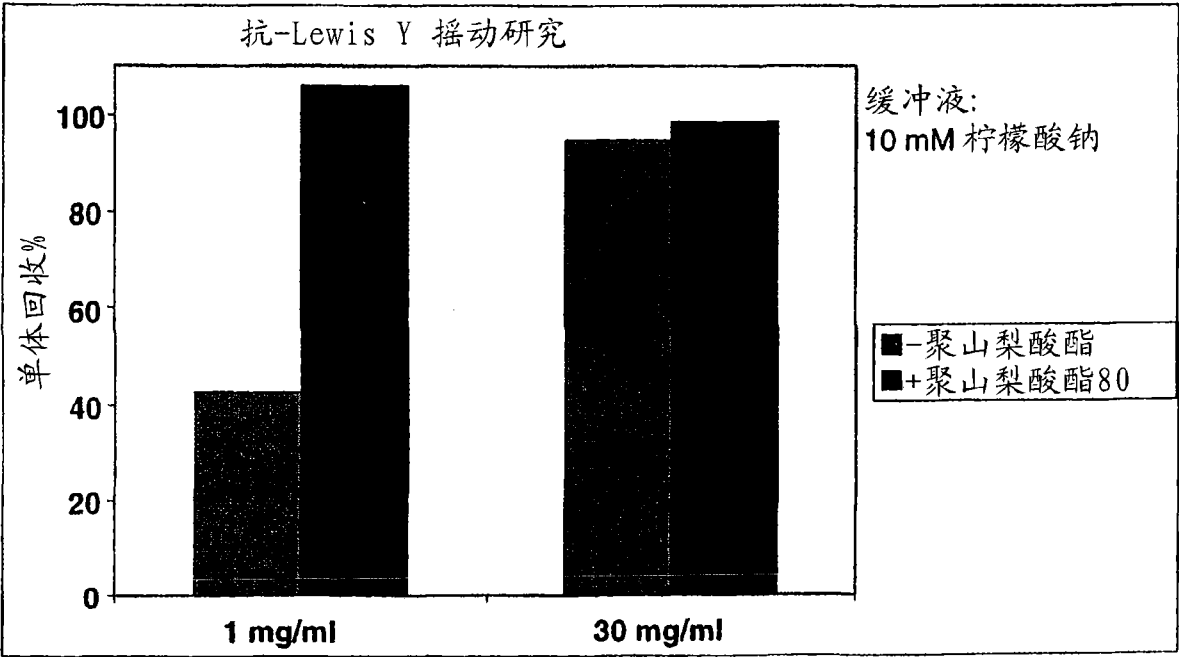


图 17A

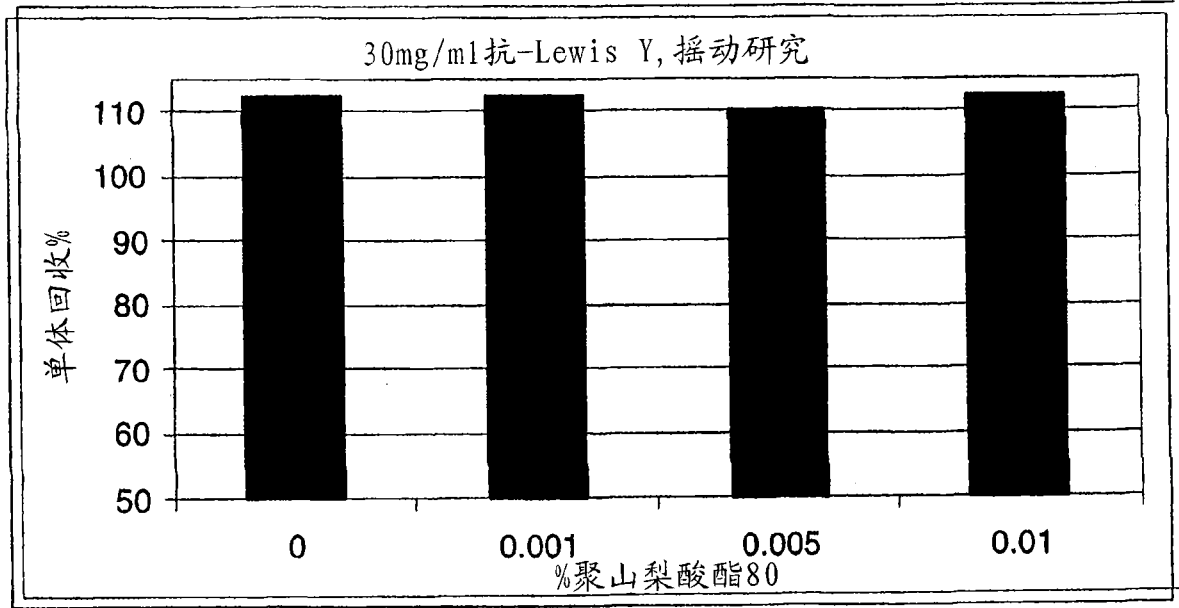


图 17B

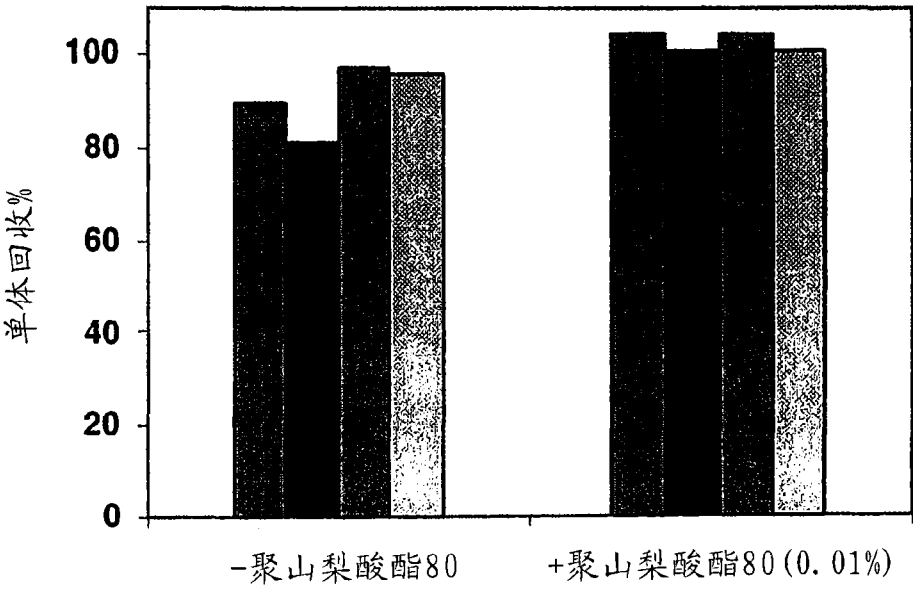


图 18A

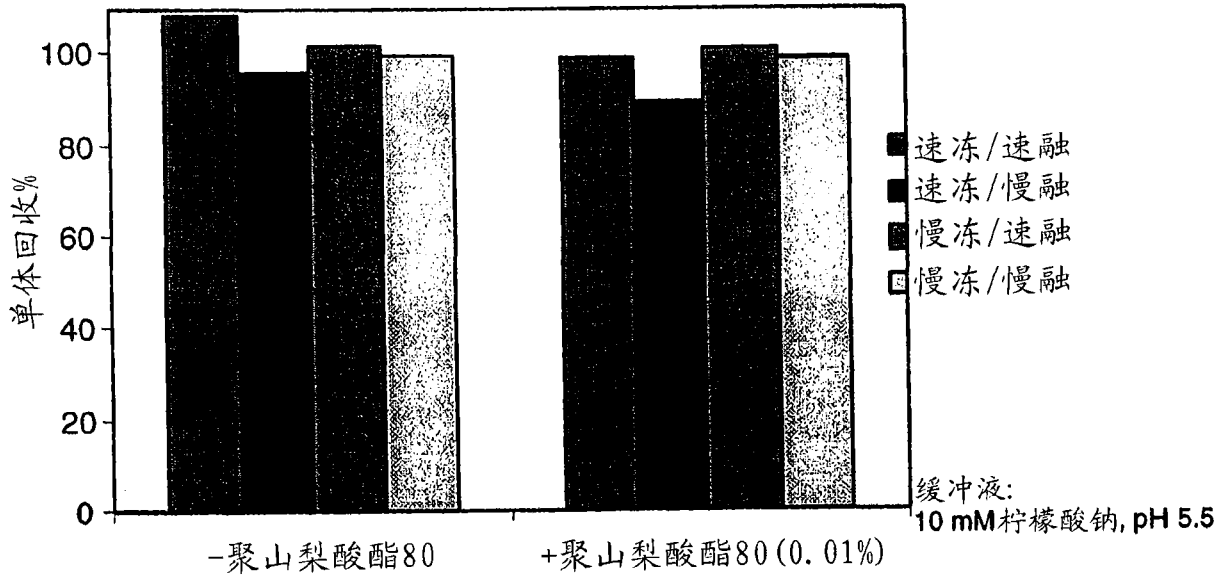


图 18B

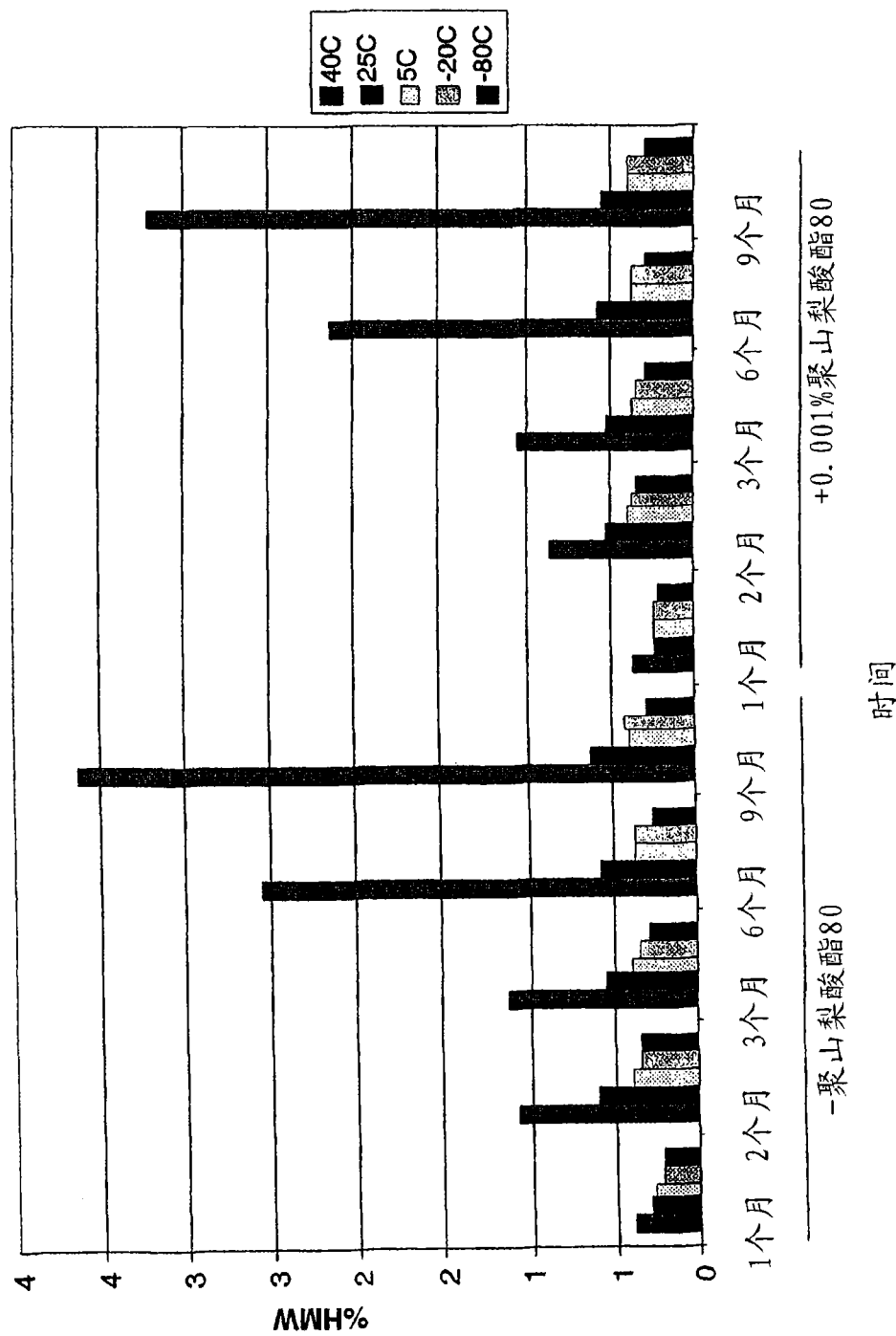


图 19A

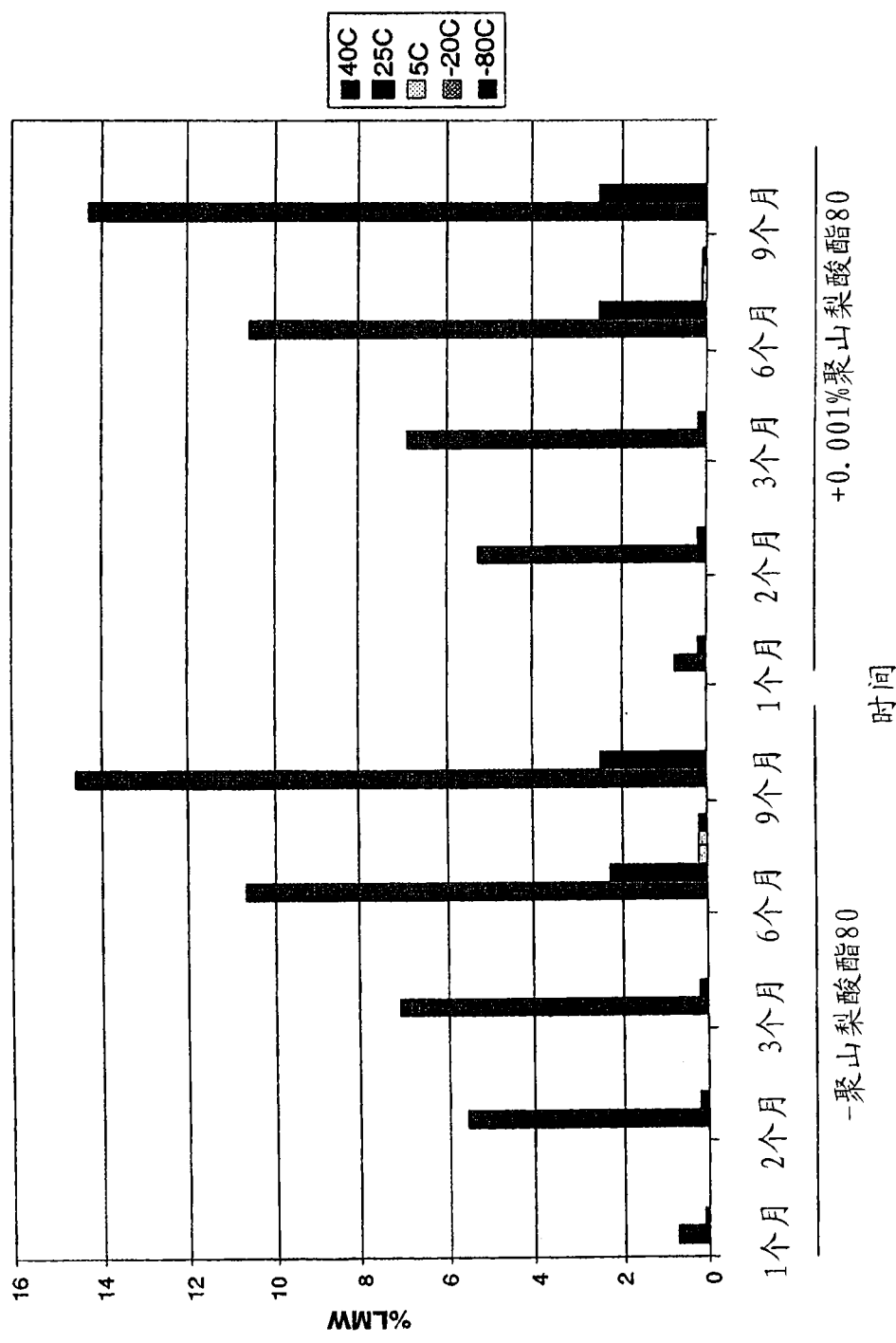


图 19B

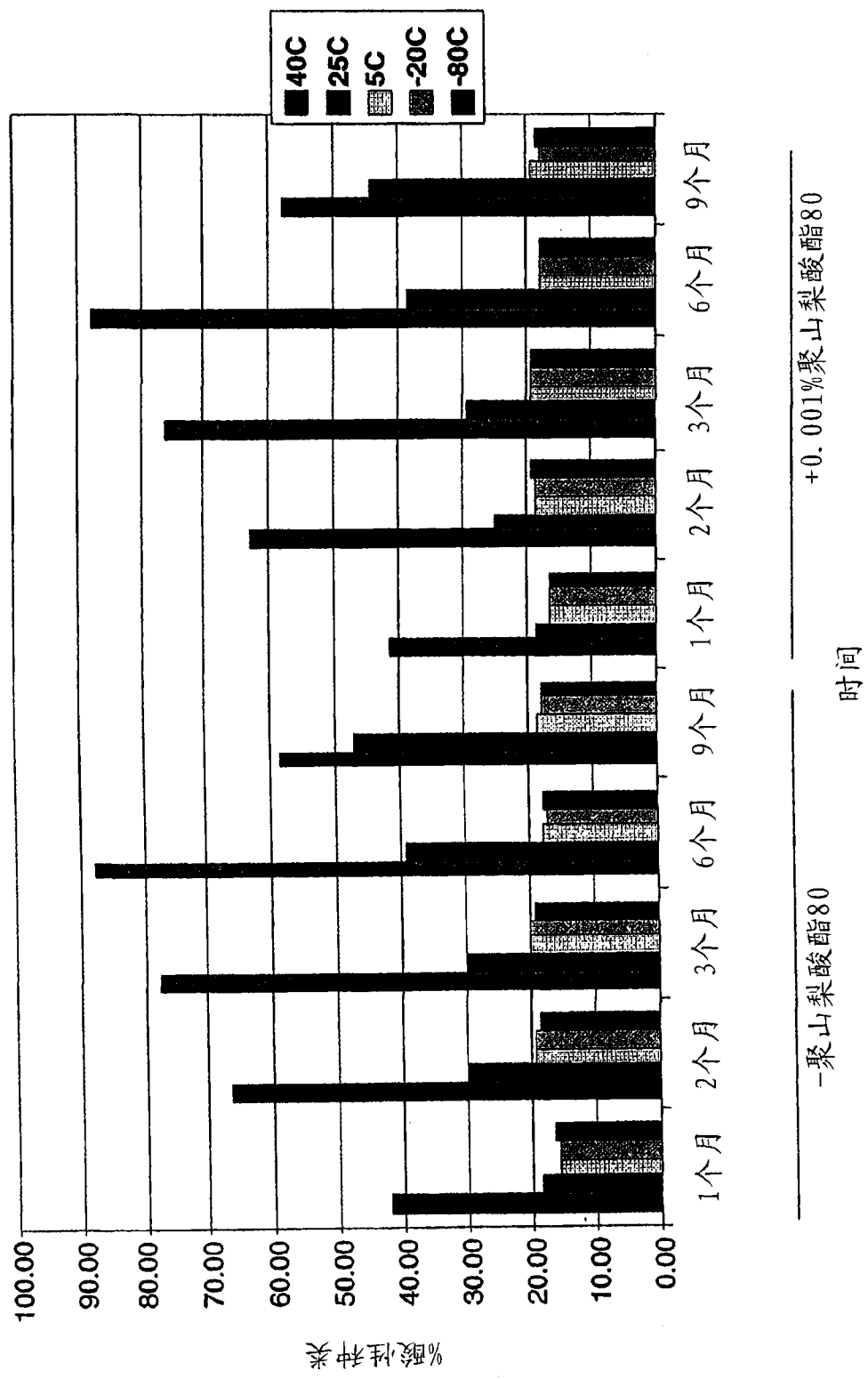


图 19C

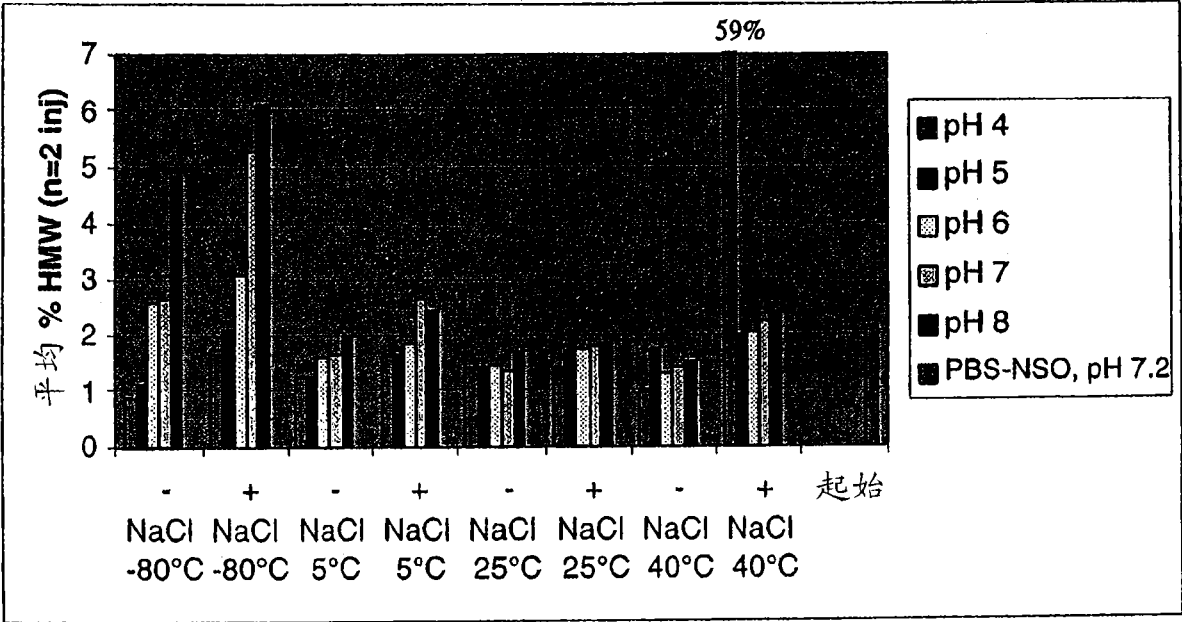
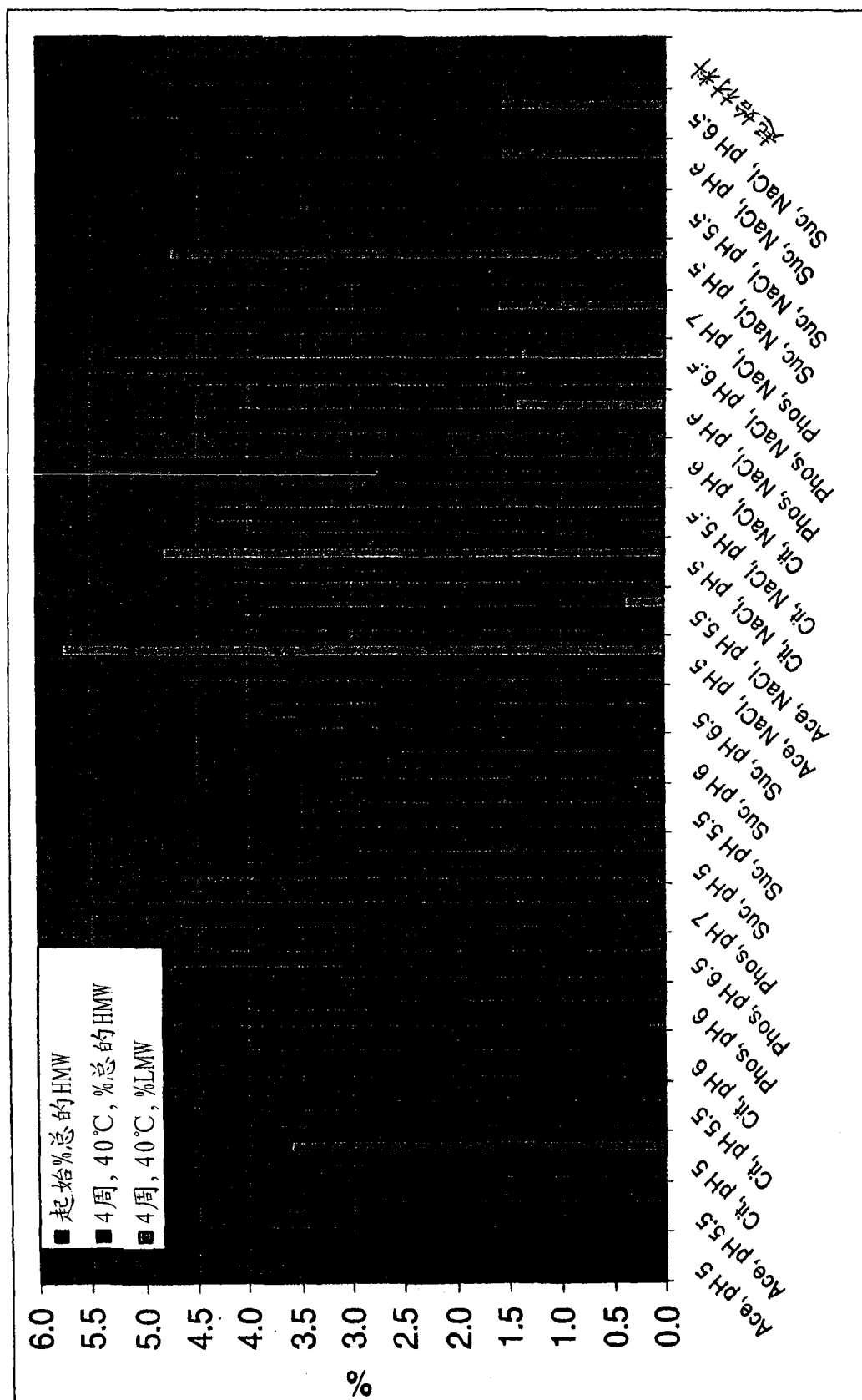


图 21



22 圖

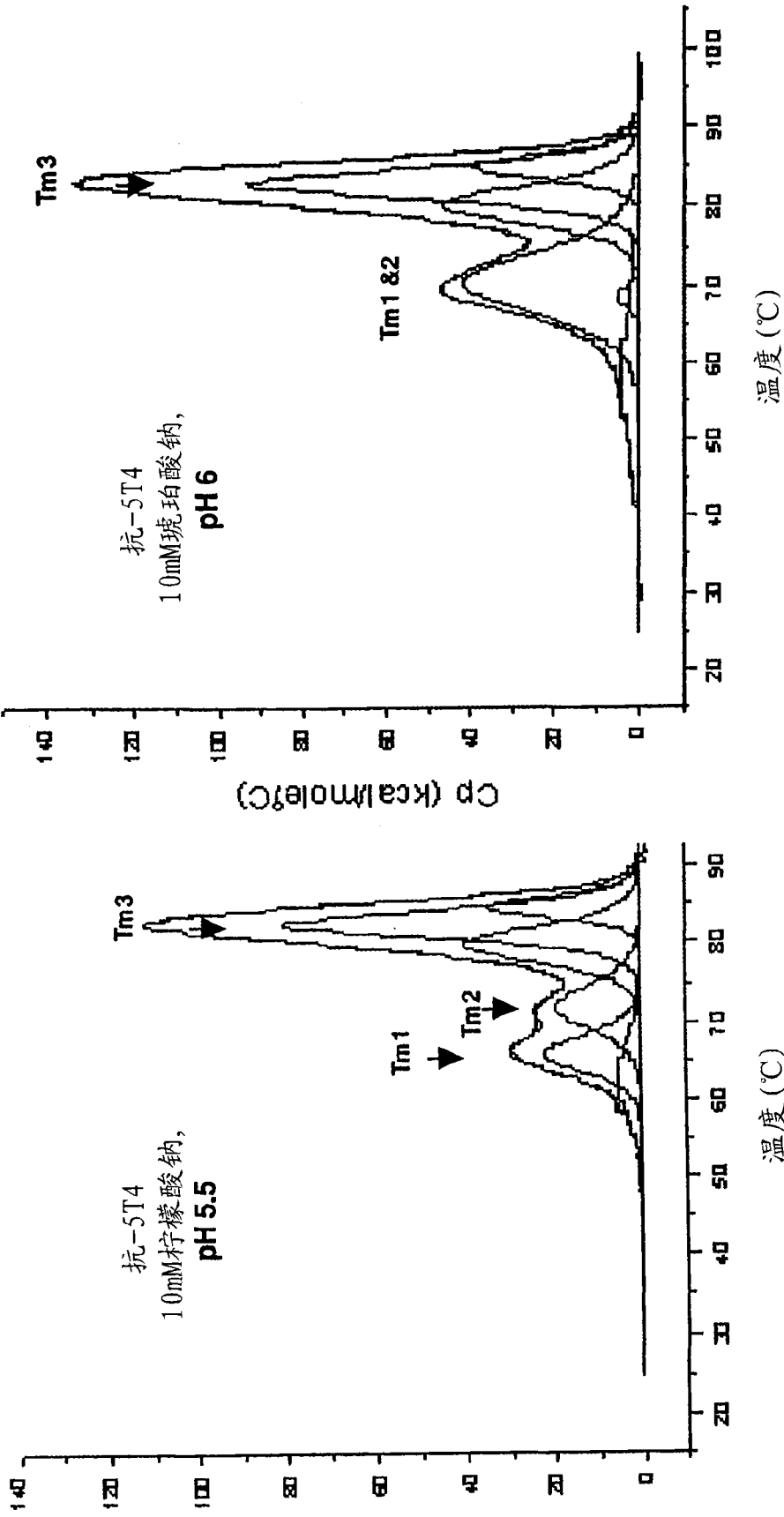


图 23A

图 23B

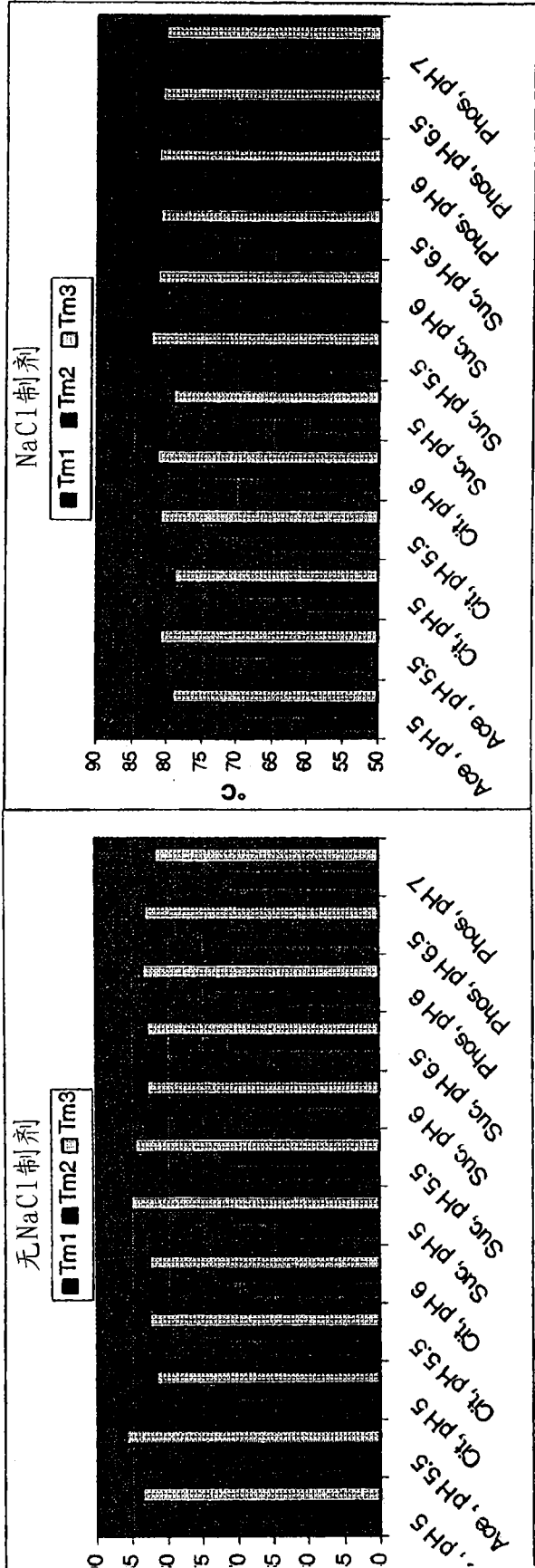


图 24A

图 24B

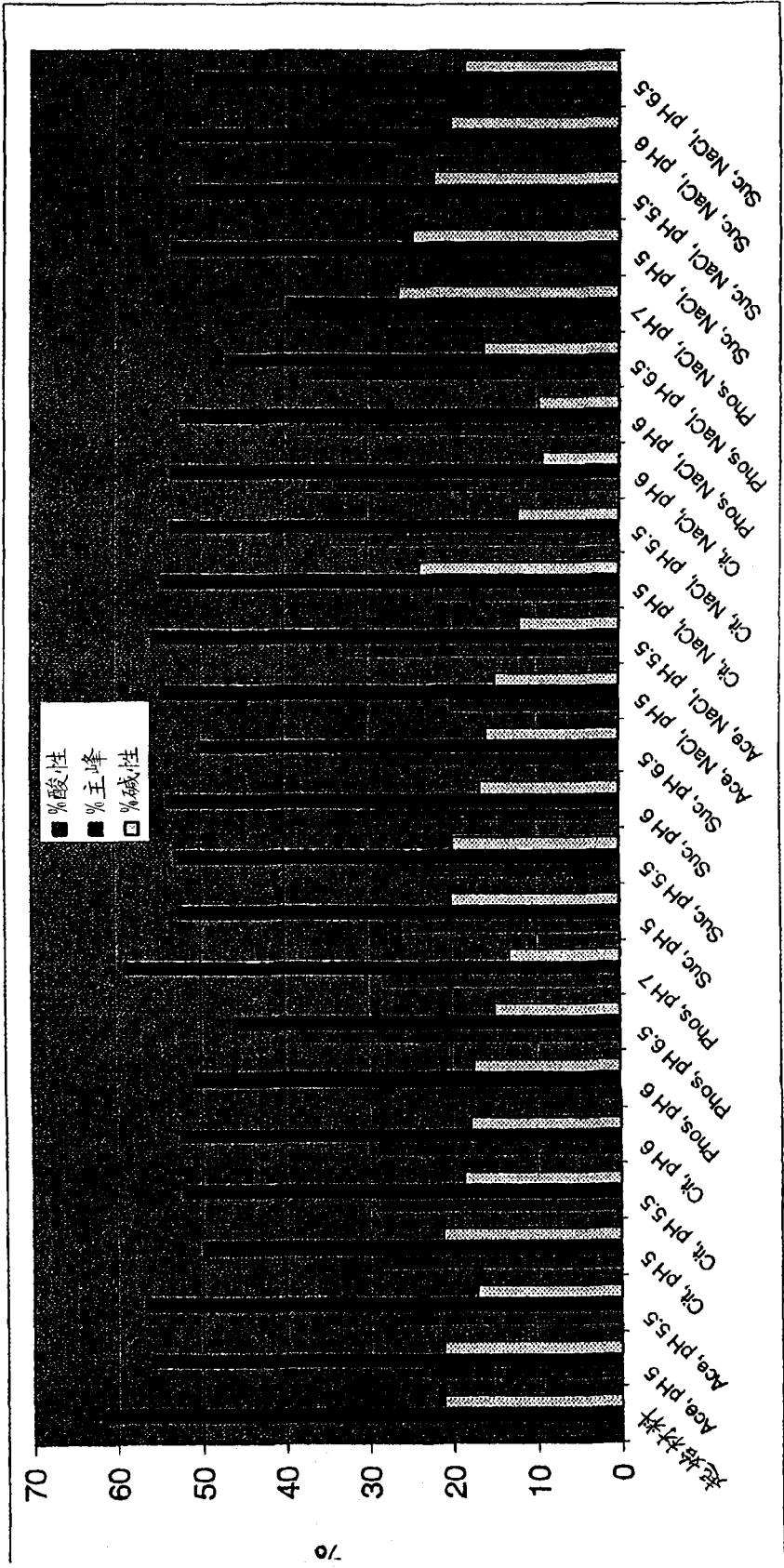


图 25

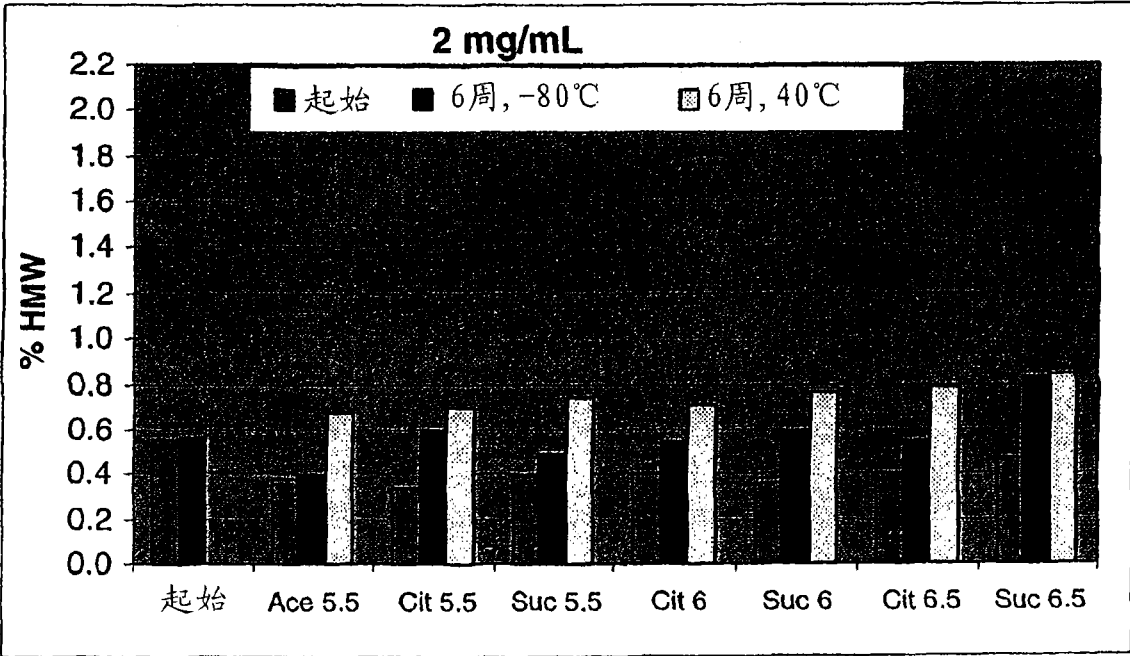


图 26A

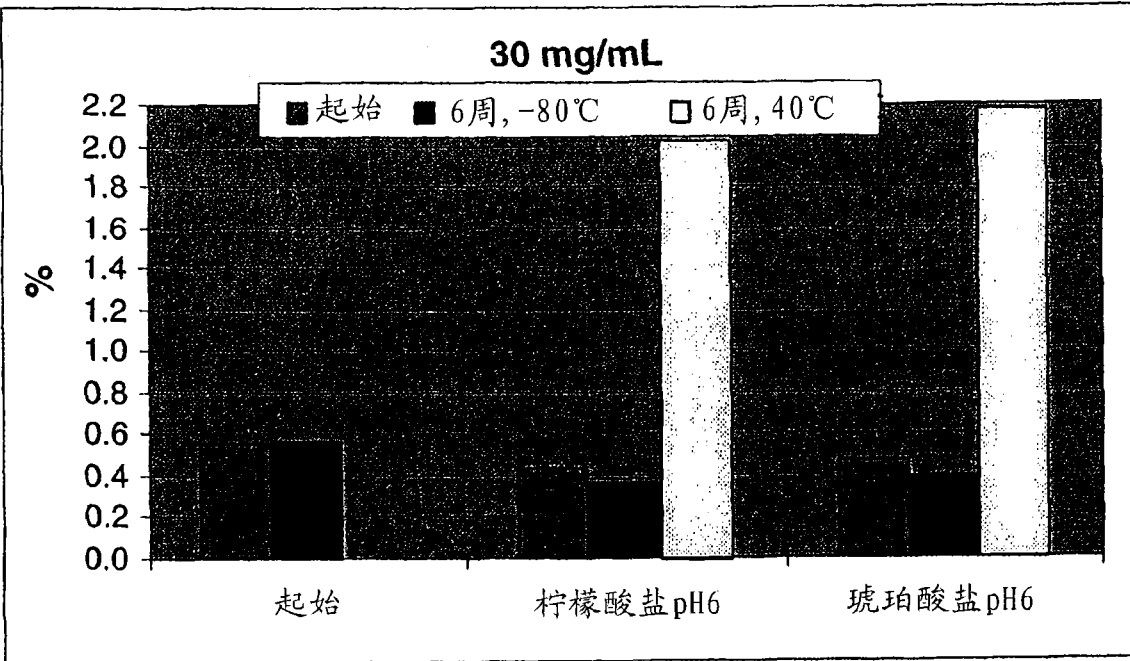


图 26B

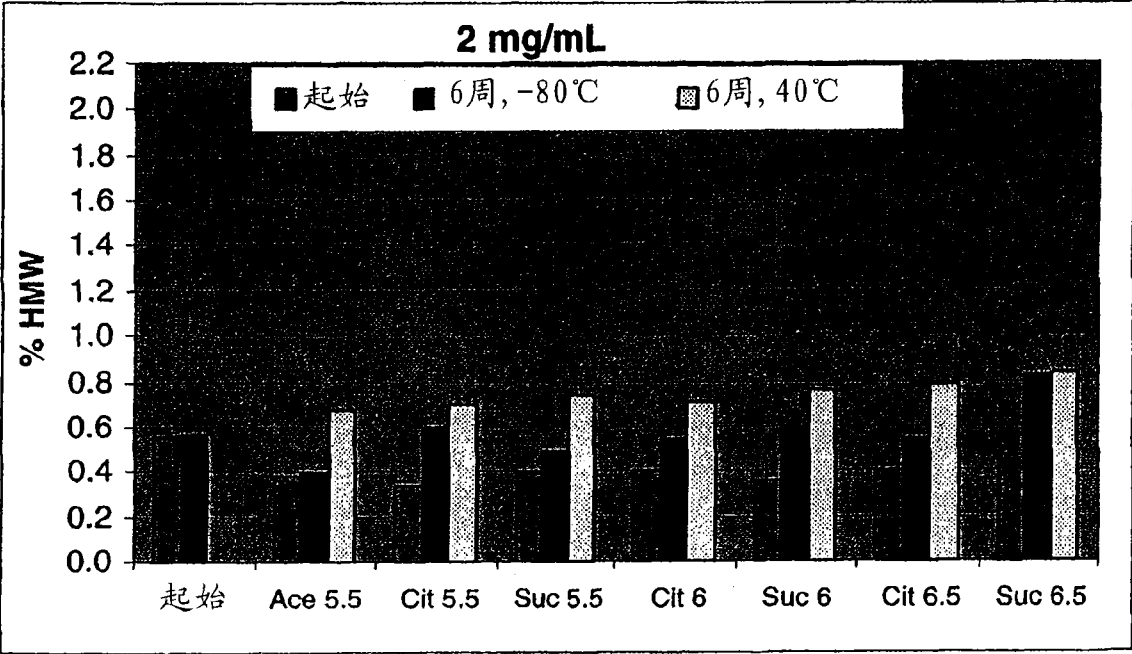


图 27A

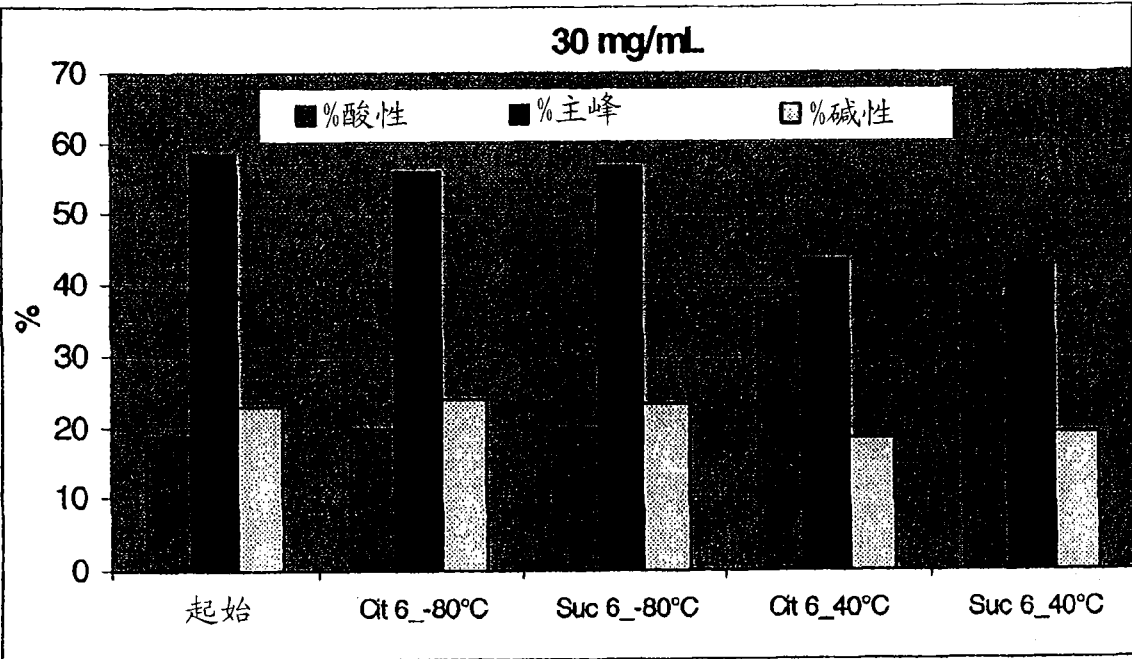


图 27B

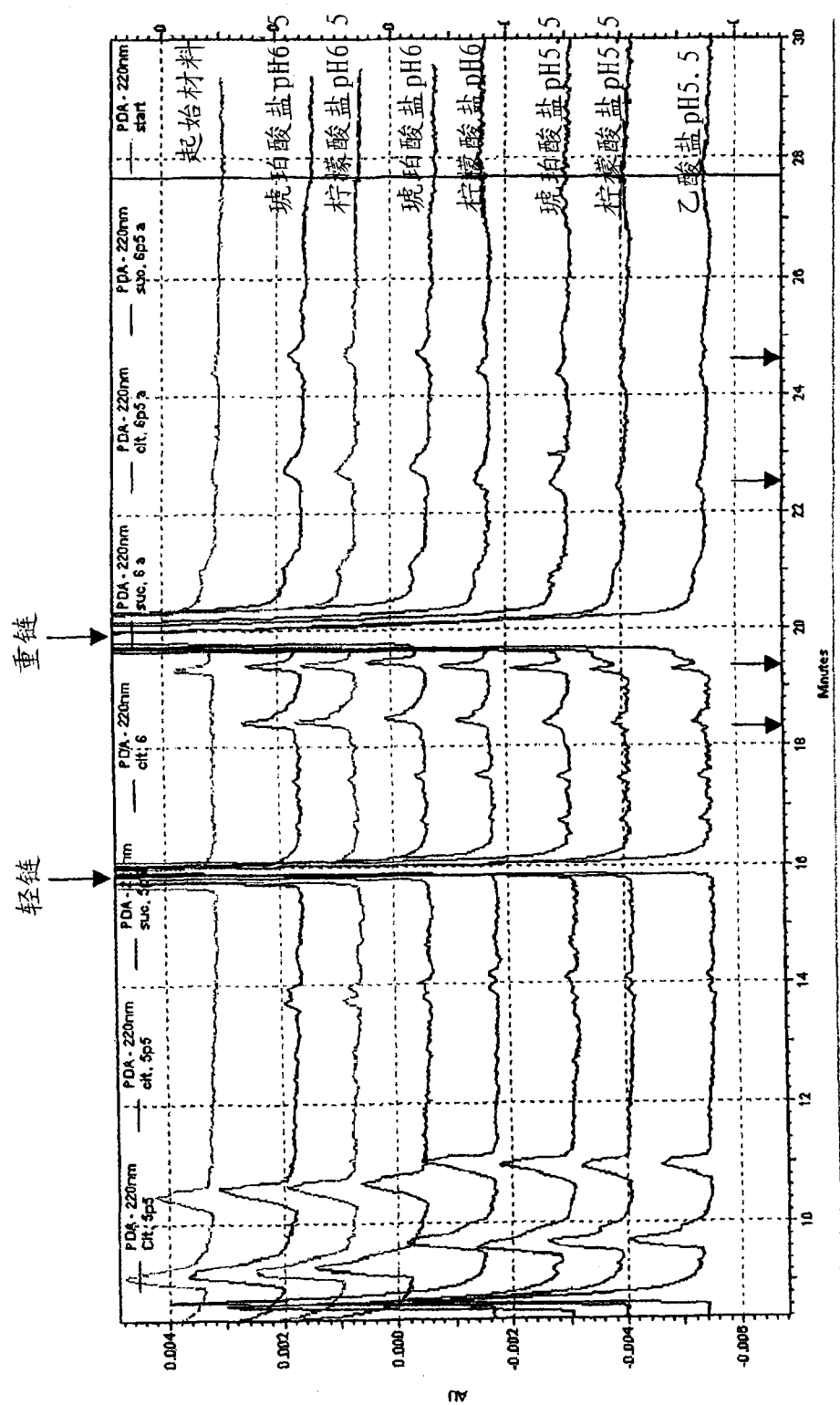


图 28

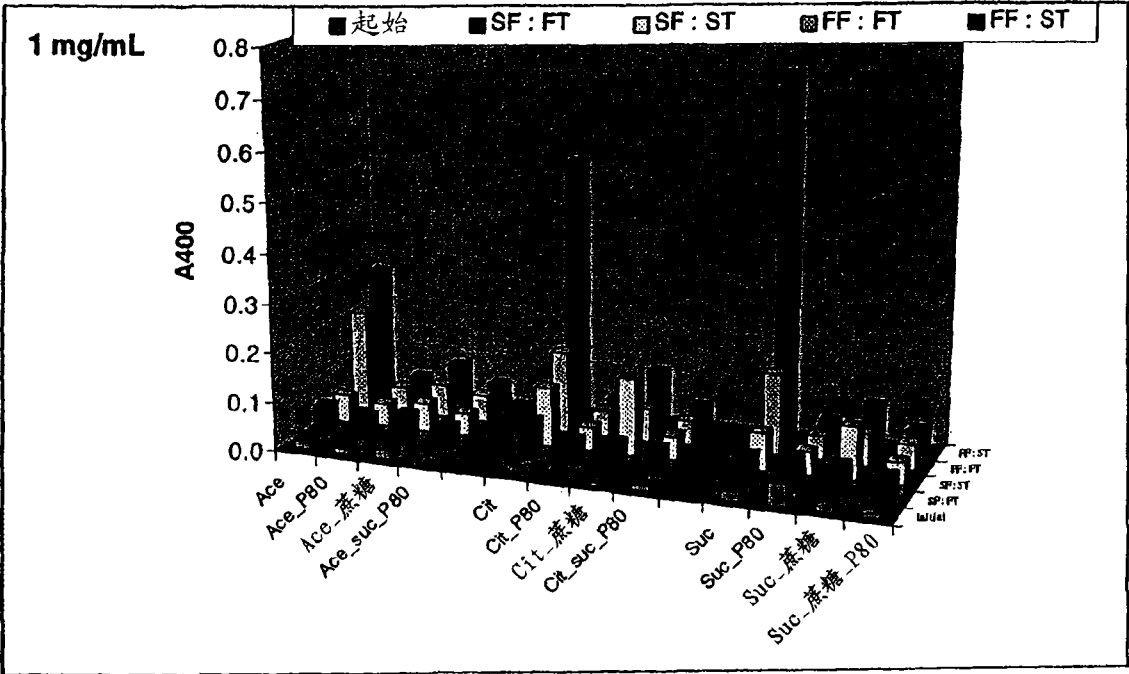


图 29A

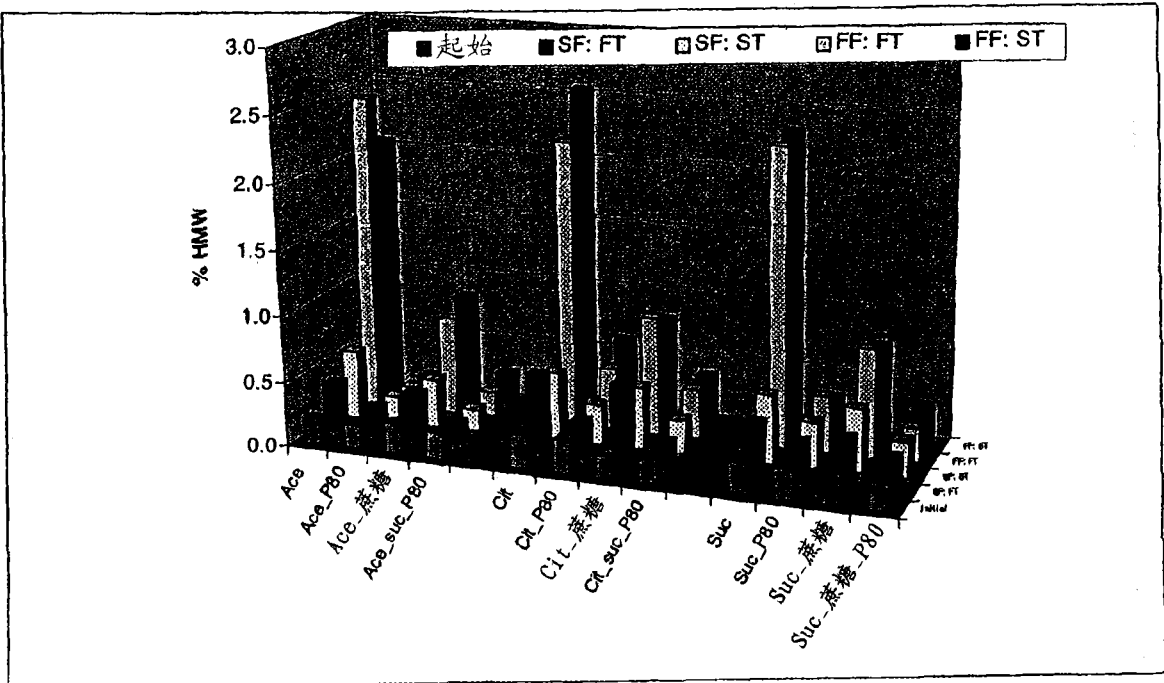


图 29B

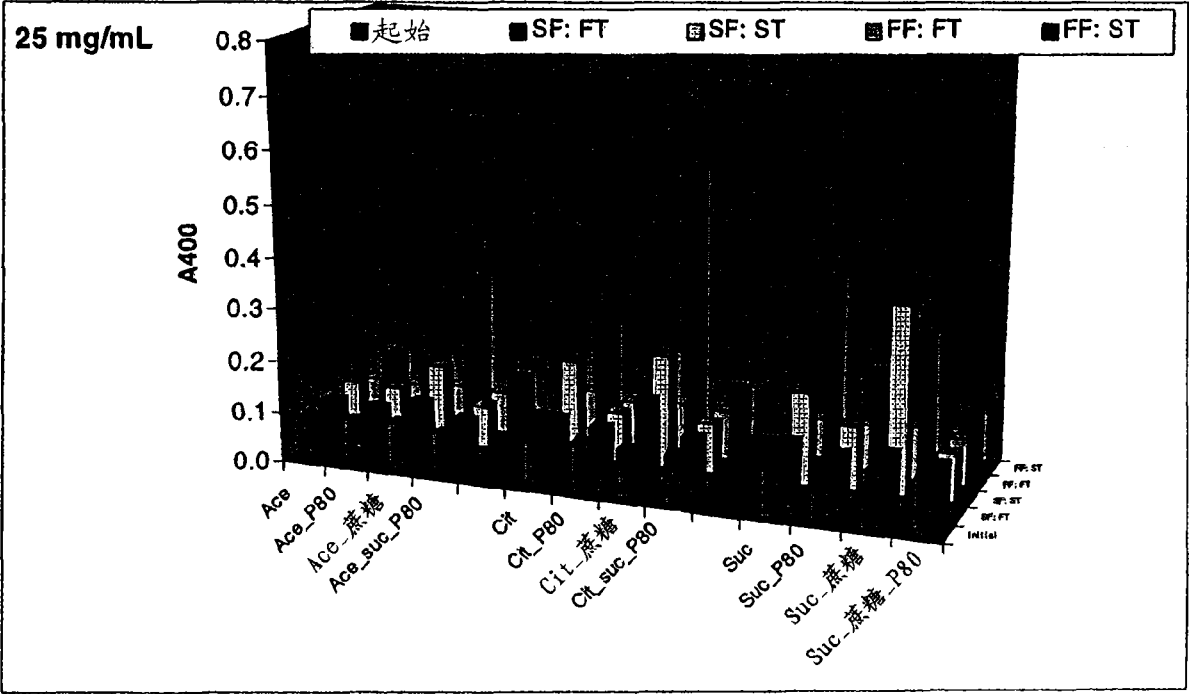


图 30A

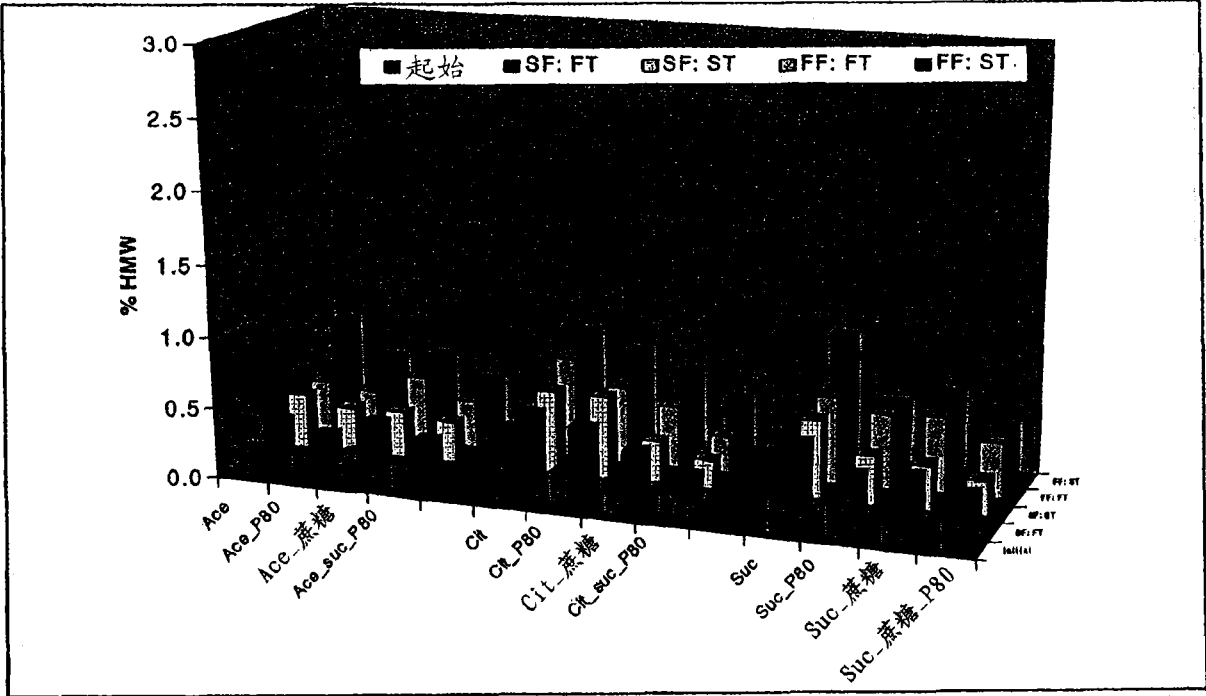


图 30B

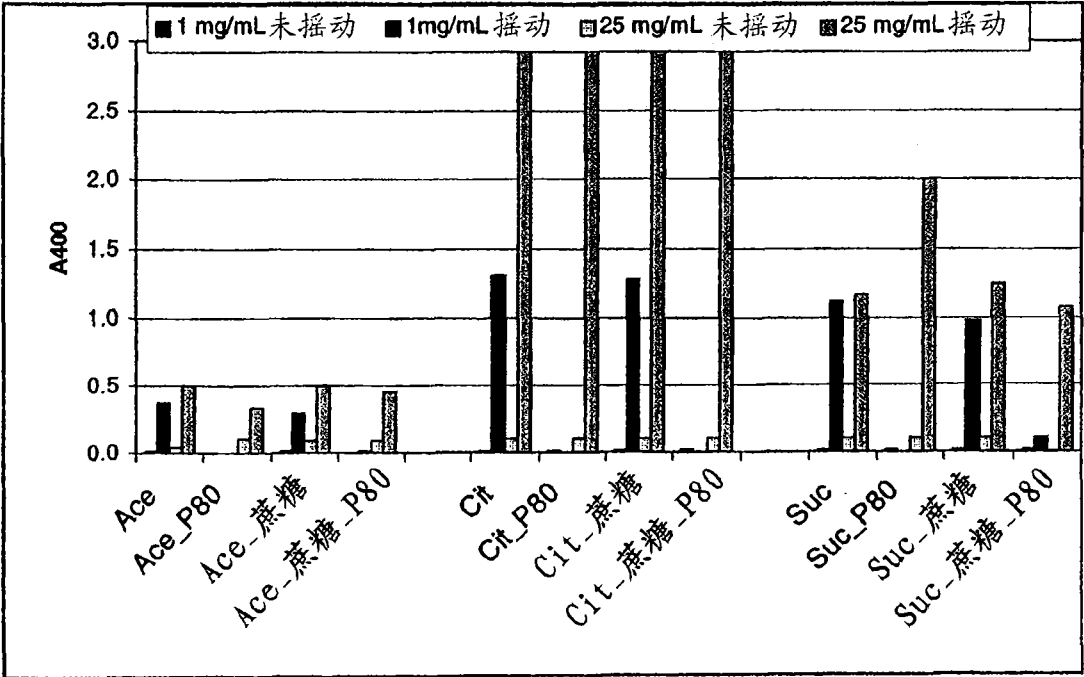


图 31A

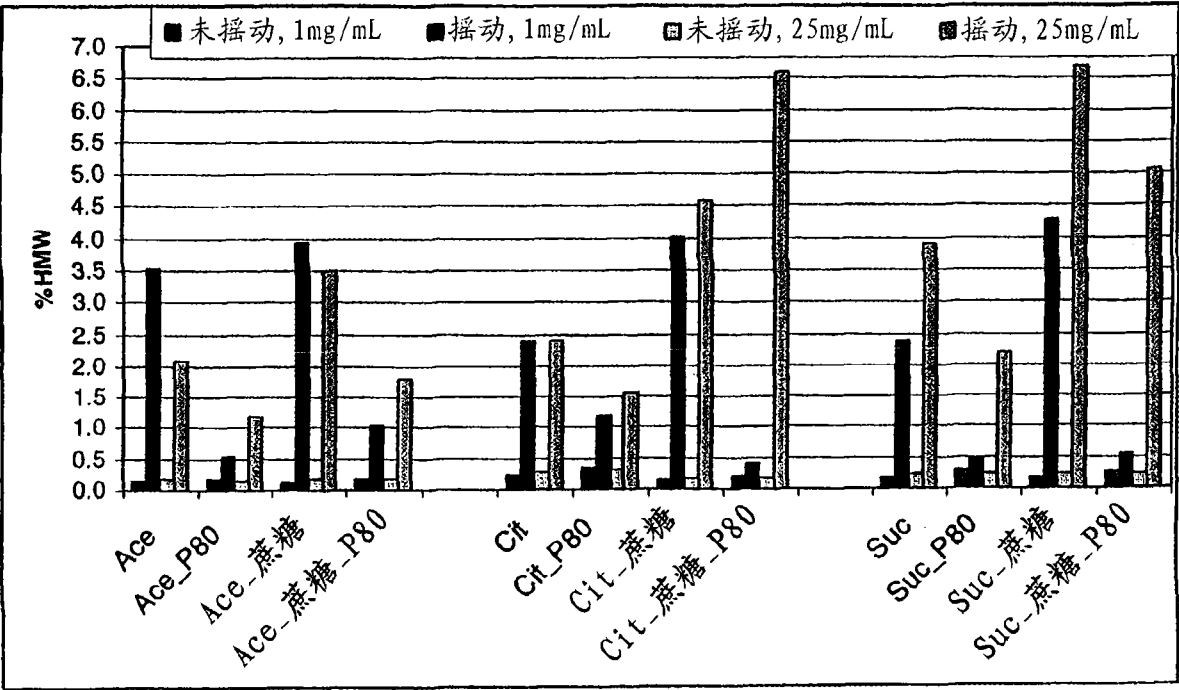


图 31B