(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117915948 A
(43)申请公布日 2024.04.19

(21)申请号 202280043351.3
(22)申请日 2022.06.17
(30)优先权数据
63/212,473 2021.06.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/034103 2022.06.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/266510 EN 2022.12.22
(71)申请人 建新公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 K·R·班加里 R·拉特波夫 T·麦考伊 S·帕特克
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/22(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 33/00(2006.01)
A61K 31/70(2006.01)
A61K 31/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书21页
序列表10页 附图28页

(54)发明名称

抗TGF-β抗体配制品及其用途

(57)摘要

本公开文本提供了包含抗TGF-β抗体的药物组合物及其使用方法。

CN 117915948 A

1.一种药物组合物,其中所述组合物是水性液体溶液,所述水性液体溶液包含:

20-200mg/ml抗TGFβ抗体,其中所述抗体包含对应于SEQ ID NO:1的残基1-120的重链可变结构域(V_H)氨基酸序列和对应于SEQ ID NO:2的残基1-108的轻链可变结构域(V_L)氨基酸序列,

10-50mM乙酸盐,任选地25mM乙酸盐,以及

5-15%w/v蔗糖,任选地8%w/v蔗糖,

其中所述溶液的pH为5.0±0.2或5.0±0.3。

2.根据权利要求1所述的组合物,其中所述抗体包含SEQ ID NO:1中所示的重链氨基酸序列(有或没有C末端赖氨酸)和SEQ ID NO:2中所示的轻链氨基酸序列。

3.根据权利要求1或2所述的组合物,所述组合物进一步包含表面活性剂。

4.根据权利要求3所述的组合物,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯,任选地聚山梨醇酯80(PS80)。

5.根据权利要求4所述的组合物,其中PS80的浓度为约0.01%-0.10%w/v,任选地0.06%w/v。

6.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述抗TGFβ抗体的浓度为40-180mg/ml,任选地50mg/ml或150mg/ml。

7.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含螯合剂,所述螯合剂任选地选自EDTA和DPTA。

8.根据权利要求7所述的组合物,其中所述螯合剂的浓度为0至20μM,任选地10μM。

9.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述水性液体溶液的pH为4.7-5.3。

10.根据权利要求1所述的组合物,所述组合物包含:

50mg/ml、75mg/ml或150mg/ml抗TGFβ抗体,

25mM乙酸盐,

10μM EDTA,

0.06%PS80,以及

8%w/v蔗糖,

所述组合物的pH为5.0±0.3。

11.根据权利要求10所述的组合物,其中所述抗体包含SEQ ID NO:1中所示的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:2中所示的轻链氨基酸序列。

12.一种制品,所述制品包含小瓶和使用说明书,其中所述小瓶含有约16ml的根据权利要求11所述的组合物。

13.一种治疗有需要的患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求1-11中任一项所述的组合物。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述方法进一步包括施用另外的抗癌治疗剂。

15.根据权利要求13或14所述的方法,其中所述组合物是以5mg/kg或15mg/kg的剂量静脉内施用,任选地每两周一次。

16.一种组合物,所述组合物用于在根据权利要求13-15中任一项所述的方法中治疗有需要的患者。

17.根据权利要求1-11中任一项所述的组合物用于制造在根据权利要求13-15中任一

项所述的方法中治疗有需要的患者的药物的用途。

抗TGF-β抗体配制品及其用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2021年6月18日提交的美国临时申请63/212,473的优先权。将本优先权申请的公开内容通过引用以其整体并入本文。

序列表

[0002] 本申请含有已以ASCII格式电子提交并且通过引用以其整体特此并入的序列表。创建于2022年6月17日的所述ASCII副本命名为022548_WO064_SL.txt并且大小为19,437字节。

背景技术

[0003] 转化生长因子β(TGF-β)是控制包括增殖、分化、存活、迁移和上皮间充质转换在内的许多关键细胞功能的细胞因子。它调节不同的生物过程,如细胞外基质形成、创伤愈合、胚胎发育、骨骼发育、造血作用、免疫和炎性应答以及恶性转化。TGF-β的失调导致病理性病症,例如出生缺陷、癌症、慢性炎症以及自身免疫和纤维化疾病。

[0004] TGF-β具有三个已知的同种型:TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3。所有三个同种型最初都被翻译为前肽。在切割之后,成熟的C末端保持与N末端缔合(被称为潜在型缔合肽或LAP),从而形成小潜在复合物(SLC),这种小潜在复合物是从细胞分泌而来。SLC无法与TGF-β受体II(TGFβRII)结合阻止了受体接合。由N末端和C末端的解离而激活通过包括蛋白水解切割、酸性pH或整合蛋白结构改变在内的若干种机制之一发生(Connolly等人,Int J Biol Sci.(2012)8(7):964-78)。

[0005] TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3在其功能上是多效性的,并且跨细胞和组织类型以不同的模式表达。它们具有相似的体外活性,但特定细胞类型中的单独敲除表明在体内的作用并不相同,尽管它们都能与同一受体结合(Akhurst等人,Nat Rev Drug Discov.(2012)11(10):790-811)。在TGF-β与TGFβRII结合时,所述受体的组成型激酶活性磷酸化并激活TGF-β受体I(TGFβRI),后者磷酸化SMAD2/3,从而允许与SMAD4缔合、定位到细胞核并且转录TGF-β应答基因。同上。除了这种经典的信号传导级联之外,非经典的途径通过包括p38 MAPK、PI3K、AKT、JUN、JNK和NF-κB在内的其他因子传输信号。TGF-β信号传导也受到包括WNT、Hedgehog、Notch、INF、TNF和RAS在内的其他途径的调控。因此,TGF-β信号传导的最终结果是所有这些信号传导途径的串扰,这种串扰整合了细胞的状态和环境。同上。

[0006] 鉴于TGF-β的不同功能,需要有效的泛TGF-β特异性抗体疗法。

发明内容

[0007] 本公开文本提供了包含抗TGF-β抗体的药物组合物。在一方面,本公开文本提供了一种药物组合物,其中所述组合物是水性液体溶液,所述水性液体溶液包含:20-200mg/ml抗TGFβ抗体,其中所述抗体包含对应于SEQ ID NO:1的残基1-120的重链可变结构域(V_H)氨基酸序列和对应于SEQ ID NO:2的残基1-108的轻链可变结构域(V_L)氨基酸序列;10-50mM乙酸盐,任选地25mM乙酸盐;以及5%-15%w/v蔗糖,任选地8%w/v蔗糖;其中所述溶液的pH

为5.0±0.2或5.0±0.3。在一些实施方案中,所述组合物是pH为4.7-5.3的水性液体溶液。

[0008] 在一些实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:1中所示的重链氨基酸序列(有或没有C末端赖氨酸)和SEQ ID NO:2中所示的轻链氨基酸序列。

[0009] 在一些实施方案中,所述抗TGFβ抗体的浓度为40-180mg/ml,任选地50mg/ml或150mg/ml。

[0010] 在一些实施方案中,所述组合物包含表面活性剂,如聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯80(PS80))。在特定实施方案中,所述组合物包含浓度为0.01%-0.10%w/v、任选地0.06%w/v的PS80。

[0011] 在一些实施方案中,所述组合物包含螯合剂,所述螯合剂任选地选自EDTA和DPTA。在某些实施方案中,所述螯合剂的浓度为0至20μM,任选地10μM。

[0012] 在特定实施方案中,所述组合物包含50mg/ml、75mg/ml或150mg/ml抗TGFβ抗体、25mM乙酸盐、10μM EDTA、0.06%PS80和8%w/v蔗糖,所述组合物的pH为5.0±0.3。在某些实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:1中所示的重链氨基酸序列(有或没有C末端赖氨酸)和SEQ ID NO:2中所示的轻链氨基酸序列。

[0013] 本公开文本还提供了一种制品,所述制品包含小瓶和使用说明书,其中所述小瓶含有约16ml的本发明组合物。

[0014] 本文还提供了一种治疗有需要的患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的本发明组合物。在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用另外的抗癌治疗剂。在特定实施方案中,所述组合物是以5mg/kg或15mg/kg的剂量静脉内施用,任选地每两周一次。本公开文本还提供了在这些方法中用于治疗有需要的患者的本发明组合物、以及本发明组合物用于制造在本公开本文的治疗方法中治疗有需要的患者的药物的用途。

[0015] 本发明的其他特征、目的和优势在以下的具体实施方式中是清楚的。然而,应当理解,尽管指示了本发明的实施方案和方面,但具体实施方式是通过仅说明而非限制的方式给出的。从具体实施方式中,本领域技术人员将清楚在本发明范围内的各种变化和修改。

附图说明

[0016] 图1是示出了80mg/ml Ab1的乙酸盐或组氨酸缓冲液配制品在一定范围的pH下的乳光度的照片。

[0017] 图2A至图2C是示出了在5℃、25℃或40℃下储存4周期间的乙酸盐和组氨酸配制品中2μm(图2A)、10μm(图2B)和25μm(图2C)显微镜下可见颗粒的演变的条形图组图。

[0018] 图3是示出了紧接在制备(T_0)之后和在40℃下储存四周之后乙酸盐和组氨酸配制品的粘度值(以厘泊(cP)为单位)的条形图。

[0019] 图4A和图4B是示出了在40℃、25℃或5℃下储存4周期间的乙酸盐和组氨酸配制品的pH的条形图组图。

[0020] 图5是示出了在T_0时和在5℃、25℃或40℃下储存4周之后乙酸盐(pH 4.7、5和5.5)和组氨酸(pH 5.5、6和6.5)的光学密度值(340-360nm)的散点图。

[0021] 图6是示出了在不同的聚山梨醇酯(PS80)浓度下在5℃下储存2周期间(左上图)、在40℃下储存2周期间(右上图)、剧烈搅拌持续48小时(左下图)和在-30℃至室温下冷冻/解冻(FT)循环(右下图)的配制品中的HMWS演变的一组图。SR_#或Ch_#:#是PS80的浓度%。

SR和Ch表示PS80的两个不同的供应商。

[0022] 图7A是示出了在聚烯烃(PO)或聚氯乙烯(PVC)IV袋中稀释于盐水或葡萄糖中之后Ab1浓度的一对条形图。

[0023] 图7B是示出了在PO或PVC IV袋中稀释于盐水(S)或葡萄糖(D)中之后在显微镜下可见(≥10μm)颗粒的一对条形图。T0:时间零点。T24:24小时。T48:48小时。

[0024] 图8A和图8B是示出了在5℃、25℃或40℃下储存12周期间(图8A)和在-20℃下储存6个月期间(图8B)的各种浓度的Ab1配制品中的HMWS演变的图。

[0025] 图9是示出了金属加标的Ab1配制品中的M252氧化(左图)和HMWS%(右图)演变的一对图。

[0026] 图10是示出了在40℃下储存一个月(左图)或在25℃下储存三个月之后各种配制品中的HMWS和亚种演变的一对条形图。

具体实施方式

[0027] 本公开文本提供了呈水性液体溶液的包含泛TGFβ特异性单克隆抗体的稳定药物组合物。一种这样的抗体是Ab1。Ab1是靶向人TGF-β的所有三个同种型(TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3)的IgG_4单克隆抗体,并且具有SEQ ID NO:1的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:2的轻链氨基酸序列。

[0028] 单克隆的抗体的治疗成功部分地取决于候选抗体药物的可制造性、稳定性和递送属性。较差的溶液行为(例如,高溶液粘度或乳光)会极大地影响抗体药物的可开发性。对Ab1的配制品研究已经显示,这种抗体具有表面活性,并且在溶液搅拌时或其他界面应力条件下具有形成显微镜下可见微粒和可见微粒的高倾向性。诸位发明人已经发现,基于酸性pH为5.0左右的乙酸盐缓冲液的本发明配制品显著地提高了配制品在储存和运输期间的稳定性,包括减少微粒形成。诸位发明人已经发现,Ab1在较高pH(例如,pH6.0)下显示出不期望的溶液行为,如乳光和较差的胶体稳定性。诸位发明人还已经发现,通过添加表面活性剂,溶液中的颗粒形成可以进一步得到缓解,并且螯合剂的包含也会帮助改进配制品。

I.泛特异性抗TGFβ单克隆抗体

[0029] 本文所配制的单克隆抗体包含Ab1中的互补决定区(CDR)。此类抗体在本文中被统称为“Ab1相关抗体”,其包括Ab1本身。在一些实施方案中,所述抗体是包含人IgG_4恒定区和人κ轻链恒定区的全人抗体。在另外的实施方案(例如,Ab1)中,所述人IgG_4恒定区具有在位置228处的突变(Eu编号)。在一些实施方案(例如,Ab1)中,所述突变是丝氨酸到脯氨酸的突变(S228P)。

[0030] Ab1的重链和轻链氨基酸序列分别以如下SEQ ID NO:1和2所示。在SEQ ID NO:1的序列中,S228P位点为方框加黑体。可变结构域是斜体的。CDR以方框示出。重链的恒定结构域中的糖基化位点为黑体(N297)。

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA PGQGLEWMGG VIPIVDIANY
AQRFKGRVTI TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL GLVLDAMDYW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO:1)

ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSLG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRAPGIP
DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYADSPITFG QGTRLEIKRT VAAPSVFIFP
PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL
TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO:2)

[0031] 在一些实施方案中,本文中的抗体具有含有上文所示的CDR的抗体(例如,人抗体)。也就是说,所述抗体具有以下重链和轻链CDR氨基酸序列:

HCDR1 SNVIS(SEQ ID NO:3)

HCDR2 GVIPIVDIANYAQRFKG(SEQ ID NO:4)

HCDR3 TLGLVLDAMDY(SEQ ID NO:5)

LCDR1 RASQSLG SSYLA(SEQ ID NO:6)

LCDR2 GASSRAP(SEQ ID NO:7)

LCDR3 QQYADSPIT(SEQ ID NO:8)

因此,所述抗体可以包含SEQ ID NO:3、4、5、6、7和8。

[0032] 在另外的实施方案中,所述抗体具有上文所示的重链可变结构域(SEQ ID NO:1的氨基酸1-120)和轻链可变结构域(SEQ ID NO:2的氨基酸1-108)。在某些实施方案中,本文所配制的抗体在重链中没有C末端赖氨酸。

[0033] 在特定实施方案中,本文所配制的抗体是Ab1。Ab1在未糖基化时的估计分子量为144kDa。Ab1的如通过质谱法确定的分子量为147.011kDa,理论实验等电点(pI)为6.78,并且实验pI为约5.9-7.1。

II.制备抗体的方法

[0034] 可以通过本领域中已建立的方法来制备Ab1相关抗体。可以将编码所述抗体的重链和轻链的DNA序列插入表达载体中,使得基因与必要的表达控制序列(如转录和翻译控制序列)可操作性连接。表达载体包括质粒、逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、植物病毒(如花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒)、粘粒、YAC、EBV来源的附加体等。可以将抗体轻链编码序列和抗体重链编码序列插入单独的载体中,并且可以使所述抗体轻链编码序列和所述抗体重链编码序列与同一或不同表达控制序列(例如,启动子)可操作地连接。在一个实施方案中,将两个编码序列插入同一表达载体中,并且可以使所述两个编码序列与同一表达控制序列(例如,共同启动子)、单独的相同的表达控制序列(例如,启动子)或不同的表达控制序列(例如,启动子)可操作地连接。可以通过标准方法将抗体编码序列插入表达载体中(例如,连接抗体基因片段和载体上的互补限制性位点,或者如果不存在限制性位点,则进行平端连接)。

[0035] 除了抗体链基因之外,重组表达载体可以携带调节序列,所述调节序列控制宿主细胞中抗体链基因的表达。用于哺乳动物宿主细胞表达的调节序列的例子包括引导哺乳动物细胞中的高水平的蛋白质表达的病毒元件,如源自逆转录病毒LTR的启动子和/或增强

子、源自巨细胞病毒(CMV)的启动子和/或增强子(如CMV启动子/增强子)、源自猿猴病毒40(SV40)的启动子和/或增强子(如SV40启动子/增强子)、源自腺病毒的启动子和/或增强子(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))、多瘤和强哺乳动物启动子(如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子)。

[0036] 除了抗体链基因和调节序列之外,本发明的重组表达载体还可以携带另外的序列(如调节宿主细胞中载体的复制的序列(例如,复制起点))和可选择标记基因。例如,可选择标记基因赋予已将载体引入其中的宿主细胞对药物(如G418、潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性。可选择标记基因可以包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(在用甲氨蝶呤选择/扩增的情况下用于dhfr-宿主细胞)、neo基因(用于G418选择)和谷氨酰胺合成酶基因。

[0037] 将编码本公开文本的抗体的表达载体引入宿主细胞以进行表达。将宿主细胞在适于表达抗体的条件下培养,然后采集和分离所述抗体。宿主细胞包括哺乳动物、植物、细菌或酵母宿主细胞。作为用于表达的宿主的可获得的哺乳动物细胞系是本领域熟知的,并且包括可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的许多永生化细胞系。这些细胞系尤其包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0细胞、SP2细胞、HEK-293T细胞、293Freestyle细胞(Invitrogen)、NIH-3T3细胞、HeLa细胞、小仓鼠肾(BHK)细胞、非洲绿猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、A549细胞和许多其他细胞系。细胞系可以基于其表达水平来选择。可以使用的其他细胞系是昆虫细胞系,如Sf9或Sf21细胞。

[0038] 此外,抗体的表达可以使用多种已知技术来增强。例如,谷氨酰胺合成酶基因表达系统(GS系统)是用于增强在某些条件下的表达的常用方法。

[0039] 用于宿主细胞的组织培养基可以包含或不含动物来源的组分(ADC),如牛血清白蛋白。在一些实施方案中,对于人身安全而言,无ADC培养基是优选的。组织培养可以使用分批补料方法、连续灌注方法或适合于宿主细胞和期望产率的任何其他方法进行。

III.抗体配制品

[0040] 本发明配制品赋予Ab1相关抗TGF-β抗体(包括Ab1)优异的稳定性。“稳定的”或“稳定性”是指组合物中的抗体的活性在储存期间和/或当经受物理或化学应力时保持其物理稳定性、化学稳定性和/或生物活性的能力。稳定性可以在选定的温度的背景下,例如在冷冻条件下(例如,-70℃至-30℃)、在冷藏条件下(例如,2℃-8℃)或在室温下(例如,23℃-25℃),持续选定的时间段,例如16周、24周、36周、四个月、六个月、一年、两年、三年或更长时间。蛋白质的稳定性可以在这样的测定中测量,所述测定在较短的时间内进行,但是所述测定的结果指示临床环境中的稳定性。此类测定包括冷冻/解冻循环测定,其中使蛋白质组合物经受一个或多个冷冻-解冻循环;或搅拌测定,其中使蛋白质组合物在预定的时间段内经受机械搅拌处理。可以通过这样的方式确定蛋白质稳定性:将蛋白质组合物在指定的储存温度(如2℃-8℃)下储存选定的时间段,并且分析其结构和功能属性,如二聚化或聚集程度(例如,如通过尺寸排阻HPLC或蛋白质凝胶测量的)、蛋白质降解(例如,如通过尺寸排阻HPLC或蛋白质凝胶测量的)、组合物的颜色变化、液体组合物的透明度、酶活性、聚糖含量和组成、受体结合亲和力、甲硫氨酸残留氧化和组合物的生物活性。还参见以下实施例以更详细地说明用于检查抗体配制品的稳定性的方法。

[0041] 如果在给定时间下的化学稳定性是使得抗体被认为维持如下文所定义的其生物活性,则本文所述的抗体在药物组合物中“保持其化学稳定性”。为了评估化学稳定性,可以

检测和定量抗体的化学改变形式。化学改变可以涉及尺寸修饰并且可以使用本领域已知的方法(如尺寸排阻色谱法、毛细管等电聚焦(cIEF)、液相色谱法/质谱法(LCMS)、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电荷改变,所述电荷改变例如可以由于脱酰胺化或氧化而发生,并且可以通过离子交换色谱法、质谱法或尺寸排阻色谱法来评价。在一些实施方案中,在包括本文所述的抗体的组合物的加速储存期间发生的一种类型的化学改变涉及抗体的氧化。在一些实施方案中,在加速储存时,在金属加标的样品中,SEQ ID NO:1的残基M252和M428被氧化。

[0042] 本公开文本的组合物含有一种或多种药学上可接受的赋形剂。术语"赋形剂"或"载体"在本文中用来描述除本发明的一种或多种化合物之外的任何成分。"赋形剂"可以是用作药物的一种或多种活性成分的稀释剂、媒介物、载体、防腐剂、粘合剂或稳定剂的惰性物质。例如,所述组合物可以含有缓冲剂、等渗剂和/或稳定剂(如抗氧化剂)。在一些情况下,一种试剂可以用于不止一个的这些目的。在一些实施方案中,本发明的组合物含有本文所述的抗TGF-β抗体、缓冲剂(如乙酸盐)、稳定剂(如蔗糖)和表面活性剂(如聚山梨醇酯80(PS80))。本文所述的抗TGF-β抗体由于组合物中特定组分的组合而具有提高的稳定性。本发明的组合物可以是水性液体溶液或冻干制剂。在优选实施方案中,本发明的组合物是水性液体溶液。

[0043] 在一些实施方案中,所述组合物包含稳定剂,如L-甲硫氨酸。在特定实施方案中,所述组合物是包含5-20mM(例如,10mM)L-甲硫氨酸的水性液体组合物。

[0044] 在一些实施方案中,所述组合物包含填充剂,如甘露糖醇。在特定实施方案中,所述组合物是包含1%-10%(例如,3.5%)甘露糖醇(w/v)的水性液体组合物。

[0045] 在一些实施方案中,所述组合物是水性液体组合物,所述水性液体组合物包含缓冲液,如L-组氨酸缓冲液。在特定实施方案中,所述水性液体组合物包含5-20mM(例如,10mM)L-组氨酸。

[0046] 在一些实施方案中,所述缓冲液的pH范围为从约4.0至约6.0。在一些实施方案中,所述缓冲液的pH为6.0。在优选实施方案中,所述缓冲液的pH为5.0±0.3。在一些实施方案中,用氢氧化钠调节所述缓冲液的pH。

[0047] 在一些实施方案中,所述组合物是包含40-180mg/ml(例如,50-150mg/ml)Ab1相关抗体、10-50mM(例如,10-30mM)乙酸盐和1%-10%(例如,6%-8%)w/v蔗糖的水性液体组合物。在一些其他实施方案中,所述组合物是包含15-40mg/mL抗TGF-β单克隆抗体、5-20mM(例如,10mM)L-组氨酸、1%-10%(例如,6-8%)蔗糖(w/v)、1%-10%(例如,3.5%)甘露糖醇(w/v)和5-20mM(10mM)L-甲硫氨酸的水性液体组合物。所述水性液体组合物的pH可以是4.0-6.0(例如,4.7-5.5)。

[0048] 在一些实施方案中,所述水性液体组合物包含0.01%-0.07%w/v的一种或多种表面活性剂。示例性的表面活性剂包括非离子型去污剂,如聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20和80)和泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆188)。在一些实施方案中,所述水性液体组合物包含0.01%-0.07%聚山梨醇酯80(例如,大于0.025%或0.05%-0.06%PS80)。在一些情况下,一种或多种表面活性剂的存在可以帮助降低液体组合物中的浊度/乳光。

[0049] 在一些实施方案中,所述水性液体组合物包含0至50μM(例如,10μM)的一种或多种螯合剂,如EDTA或DPTA。

[0050] 在优选实施方案中,所述组合物是包含50或150mg/ml抗TGF-β单克隆抗体、25mM乙酸盐、10μM EDTA或DPTA、0.06%PS80和8%w/v蔗糖的水性液体组合物。在特定实施方案中,所述水性液体组合物的pH为5±0.3。

[0051] 在一些实施方案中,所述组合物是包含25mg/mL抗TGF-β单克隆抗体、10mM L-组氨酸、2%(w/v)蔗糖、3.5%(w/v)甘露糖醇、10mM L-甲硫氨酸、0.01%(w/v)聚山梨醇酯80的水性液体组合物,且所述水性液体组合物的pH为6.0。在特定实施方案中,所述组合物是包含25mg/mL抗TGF-β单克隆抗体、1.18mg/mL L-组氨酸单盐酸盐、0.68mg/mL L-组氨酸、1.5mg/mL L-甲硫氨酸、0.1mg/mL聚山梨醇酯80、20mg/mL蔗糖和35.3mg/mL甘露糖醇的水性液体组合物,其pH为6.0。

成分	浓度(mg/mL)
Ab1	25.0
L-组氨酸单盐酸盐	1.18
L-组氨酸	0.68
L-甲硫氨酸	1.50
聚山梨醇酯80	0.10
蔗糖	20.0
甘露糖醇	35.3
注射用水	适量

[0052] 所述水性液体组合物可以通过这样的方式制备:将通过重组技术产生并且随后从宿主细胞纯化的Ab1与本文所述的赋形剂在水中混合,并且将所得的混合物调节至期望pH。例如,可以将抗TGF-β单克隆抗体和期望的赋形剂添加至或经缓冲液交换至期望pH的乙酸盐缓冲液中。

[0053] 在一些实施方案中,所述水性液体组合物可以通过重构本发明的冻干组合物来制备。可以用药学上可接受的液体(如无菌水、盐水(例如,0.9%氯化钠)或乙酸盐缓冲盐水)来完成重构。

IV.制品

[0054] 本发明的组合物可以在制品(例如,试剂盒)中提供,所述制品包含使用说明书和任选地用于治疗障碍的其他治疗剂。所述制品中的活性药物成分(API)(例如,Ab1)可以以按照本文所述的给药方案容易施用的量提供。

[0055] 例如,所述制品可以包含在16mL的水性液体溶液中含有800mg Ab1的小瓶,所述水性液体溶液包含25mM乙酸盐、8%蔗糖、10μM EDTA或DTPA、0.06%PS80,其pH为5.0±0.3。在一些实施方案中,所述小瓶含有800mg的Ab1、15mg的乙酸盐、800mg的蔗糖和6mg的PS80。在一些实施方案中,所述小瓶含有800mg的Ab1、24mg的乙酸盐、1280mg的蔗糖和9.6mg的PS80。在特定实施方案中,所述小瓶是含有标准封闭物的经预处理的玻璃小瓶。例如,所述小瓶可以是带有West 20mm塞子作为封闭物的ISO 20R类型1管状玻璃小瓶。

[0056] 本发明组合物可以在-3℃至5℃下储存两年或更多年。

V.Ab1和相关抗体的用途

[0057] TGF-β受体在免疫细胞上广泛表达,从而导致TGF-β在先天免疫系统和适应性免疫系统两者中的广泛作用。TGF-β已经与许多患病病症有关联,例如出生缺陷、癌症、慢性炎症、自身免疫和纤维化疾病。可以使用治疗量的Ab1或相关抗体来治疗这些病症。“治疗有

效”量是指Ab1、相关抗体或本文所提及的另一种治疗剂的如下量,其缓解所治疗的病症的一种或多种症状。这种量可以基于正在治疗的病症或患者而变化,并且可以由医疗保健专业人员使用既定的原则来确定。

[0058] 本文所述的药物组合物的适当的剂量水平可以基于多种因素确定,包括患者的年龄、体重、疾病状况、总体健康状况和病史;以及药物施用的途径和频率;药物中Ab1活性成分的药效学和药代动力学;和患者可能同时服用的任何其他药物。在一些实施方案中,所述Ab1或相关抗体可以以40、20或15mg/kg或更少(如14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1mg/kg)施用。在一些实施方案中,所述Ab1可以以5mg/kg和15mg/kg施用。给药频率可以为例如每天、每两天、每三天、每四天或每五天、每周、每两周或每三周、每月或每两月。在一些实施方案中,给药频率可以是每两周。如临床医生确定是适当的,连续剂量之间的间隔可以是两周或短于或长于两周。

[0059] 所述抗体可以静脉内施用(例如,经0.5-8小时的静脉输注)、皮下施用、局部施用或适合于病症和药物配制品的任何其他施用途径施用。

[0060] Ab1和相关抗体源自人源抗体基因,因此在人体中具有低免疫原性;然而,当用Ab1或相关抗体治疗患者时,可以监测患者的不良事件。

[0061] 在一些实施方案中,本发明的抗体的功效可以由在患者体内(例如,在患者体内的受累组织(如肿瘤组织)中)出现以下中的一个或多个来指示:(1)TGF-β水平或活性降低;(2)MIP2和/或KC/GRO水平提高;(3)CD8+T细胞(如INF-γ-阳性CD8+T细胞)对肿瘤组织的激活和浸润;以及(4)自然杀伤(NK)细胞的聚集增加。

[0062] 所述患者可以是成人(例如,18岁或以上的患者,包括65岁或以上的老年患者)。所述患者可以是儿科患者(小于18岁的患者,例如新生儿至6岁、6至12岁或12至18岁的患者)。

[0063] 在某些实施方案中,每两周以5mg/kg或15mg/kg向患者静脉内施用含有50mg/ml Ab1并且含有25mM乙酸盐、8%蔗糖、10μM EDTA或DPTA和0.06%PS80的药物Ab1组合物(pH 5.0±0.3)(例如,在10mL小瓶中提供),直到已经实现期望的治疗终点的这一时间为止。对于IV施用,可以将Ab1组合物稀释于盐水或IV葡萄糖液(通常在水中含有5%葡萄糖)中。可以使用例如PO或PVC IV袋。在一些实施方案中,在使用之前将Ab1配制品在PVC袋中稀释于盐水中。在一些实施方案中,在使用之前将Ab1配制品在PVC袋中稀释于IV葡萄糖液中。在一些实施方案中,在使用之前将Ab1配制品在PO袋中稀释于盐水中。在一些实施方案中,在使用之前将Ab1配制品在PO袋中稀释于IV葡萄糖液中。

A.非肿瘤学患病病症

[0064] 可以通过Ab1和相关抗体治疗的病症可以包括但不限于骨缺损(例如,成骨不全症)、血管球性肾炎、神经或皮肤瘢痕、肺或肺部纤维化(例如,特发性肺部纤维化)、辐射诱导的纤维化、肝纤维化、骨髓纤维化、硬皮病、免疫介导疾病(包括类风湿性关节炎、多发性硬化症、全身性红斑狼疮、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、Berger病和移植排斥)和杜普伊特伦挛缩(Dupuytren's contracture)。

[0065] 它们还可以可用于治疗、预防肾功能不全和降低发生肾功能不全的风险,所述肾功能不全包括但不限于局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)、糖尿病(I型和II型)肾病、放射性肾病、梗阻性肾病、弥漫性全身性硬化症、遗传性肾脏疾病(例如,多囊性肾病、髓质海绵肾、马蹄肾)、血管球性肾炎、肾硬化、肾钙质沉着症、全身性或肾小球性高血压、小管间质性肾

病、肾小管酸中毒、肾结核和肾梗塞。特别地,它们在与肾素-血管紧张素-醛固酮系统的拮抗剂组合时是有用的,所述拮抗剂包括但不限于:肾素抑制剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、Ang II受体拮抗剂(也被称为“Ang II受体阻断剂”)和醛固酮拮抗剂。参见例如WO 2004/098637,将其公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0066] Ab1和相关抗体可用于治疗与ECM的沉积相关的疾病和病症,如全身性硬化症、术后粘连、瘢痕疙瘩和增生性瘢痕、增殖性玻璃体视网膜病变、青光眼引流手术、角膜损伤、白内障、佩罗尼氏病(Peyronie's disease)、成人呼吸窘迫综合征、肝硬化、心肌梗死后瘢痕、血管成形术后再狭窄、蛛网膜下腔出血后瘢痕、椎板切除术后纤维化、肌腱修复和其他修复后纤维化、胆汁性肝硬变(包括硬化性胆管炎)、心包炎、胸膜炎、气管造口术、穿透CNS损伤、嗜酸性肌痛综合征、血管再狭窄、静脉阻塞性疾病、胰腺炎和干癣性关节病变。

[0067] Ab1和相关抗体进一步可用于其中促进上皮再形成是有益的病症。此类病症包括但不限于皮肤的疾病(如静脉溃疡、缺血性溃疡(压疮)、糖尿病性溃疡、移植部位、移植接受部分、擦伤和烧伤)、支气管上皮的疾病(如哮喘、ARDS)、肠上皮的疾病(如与细胞毒性治疗相关的粘膜炎、食管溃疡(反流病)、胃食管返流病、胃溃疡、小肠和大肠病变(炎性肠病))。

[0068] Ab1和相关抗体的仍另外的用途是在如下病症中,在所述病症中内皮细胞增殖是期望的,例如稳定动脉粥样硬化斑块、促进血管吻合的治愈;或在如下病症中,在所述病症中抑制平滑肌细胞增殖是期望的(如在动脉疾病、再狭窄和哮喘中)。

[0069] Ab1和相关抗体还可用于增强对巨噬细胞介导的感染(如由利什曼虫属(Leishmania spp.)、克氏锥虫(Trypanosorna cruzi)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)和麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)以及原生动物刚地弓形虫(Toxoplasma gondii)、真菌荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、白色念珠菌(Candida albicans)、平滑念珠菌(Candida parapsilosis)和新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)引起的感染)的免疫应答。它们还可用于降低例如由肿瘤、AIDS或肉芽肿性疾病引起的免疫抑制。

[0070] Ab1和相关抗体还可用于预防和/或治疗眼科病症,如青光眼和小梁切除术后瘢痕。

B.肿瘤学患病病症

[0071] TGF-β调节若干种生物过程,包括细胞增殖、上皮间充质转换(EMT)、基质重塑、血管生成和免疫功能。这些过程中的每种过程都促成肿瘤进展。TGF-β在癌症患者中跨适应证的广泛有害作用也通过其在肿瘤微环境内的升高以及全身性升高而表明。参见例如Kadam等人,Mo Biomark Diagn.(2013)4(3):1-8。研究已经显示,在恶性状态下,TGF-β可以诱导EMT,并且所得的间充质表型使得细胞迁移和侵袭增加。

[0072] 包含Ab1和相关抗体的组合物可用于治疗过度增殖性疾病,如癌症,包括但不限于皮肤癌(例如,黑色素瘤(包括不可切除或转移性黑色素瘤)、皮肤鳞状细胞癌和角化棘皮瘤)、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、食管癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌、肝癌(例如,肝细胞癌)、原发性腹膜癌、膀胱癌、肾癌(renal cancer)或肾癌(kidney cancer)(例如,肾细胞癌)、尿路上皮癌、乳腺癌、卵巢癌、输卵管癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、头颈癌(例如,头颈部鳞状细胞癌)、脑癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、间皮瘤、白血病和淋巴瘤。

[0073] 在一些实施方案中,包含Ab1和相关抗体的组合物可用于治疗基于抗PD-1、抗PD-

L1或抗PD-L2治疗剂的先前疗法已经失败或预期失败的患者(即作为或预期作为对抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2疗法的无反应者的患者)的癌症,。在一些实施方案中,Ab1和相关抗体可用于治疗在先前的抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2疗法后已复发的患者的癌症。如本文所用,术语“预期”意指医学领域技术人员可以在没有施用疗法的情况下基于他/她的医学常识和患者的特定病症预见患者是否是反应者或无反应者以及疗法是否将会失败或将不会有效。

[0074] 在一些实施方案中,所述癌症是实体瘤的间充质亚型,包括但不限于间充质结直肠癌、间充质卵巢癌、间充质肺癌、间充质头癌和间充质颈癌。上皮间充质转换(EMT)通过下调上皮细胞基因和增强间充质基因表达而促进细胞迁移和侵袭特性。EMT是肿瘤进展和侵袭的标志。多达四分之一的结直肠癌和卵巢癌是间充质的。因此,通过抑制TGF-β和其对EMT的诱导,Ab1或相关抗体可以用于治疗间充质实体瘤。实体瘤的间充质亚型可以通过多个遗传标记物和病理学测试来鉴定。标记物包括ACTA2、VIM、MGP、ZEB2和ZWINT,这些标记物可以通过qRT-PCR或免疫组织化学来检测。此类标记物可以用于选择患者进行本发明的抗TGFβ单一疗法或组合疗法。

[0075] 在一些实施方案中,Ab1和相关抗体可用于治疗患有晚期实体瘤的患者。

[0076] 包括Ab1和相关抗体的组合物还可以用于治疗造血功能障碍或恶性肿瘤(如多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)和白血病)以及各种肉瘤(如卡波济氏肉瘤(Kaposi’s Sarcoma))。

[0077] 包括Ab1和相关抗体的组合物还可以可用于抑制环孢霉素介导的恶性肿瘤或癌症进展(例如,转移)。

[0078] 当然,应当了解,在癌症疗法的上下文中,“治疗”包括使得癌症生长减缓、癌症进展或复发延迟、癌症转移减少以及癌症部分缓解以便延长患者的预计寿命的任何医学干预。

C.肿瘤学中的组合疗法

[0079] 已经观察到,癌症中细胞毒性T细胞浸润的水平与有利临床结局相关(Fridman等人,Nat Rev Cancer(2012)12(4):298-306;和Galon等人,Immunity(2013)39(1):11-26)。另外,辅助细胞毒性T细胞(CD4+TH1)的T辅助细胞以及它们所产生的细胞因子(例如,IFN-γ)通常也与阳性患者结局相关。相比之下,已经显示,Treg细胞的存在与较差患者预后相关(Fridman,同上)。

[0080] TGF-β抑制抗肿瘤免疫应答的几乎所有方面。细胞因子促进iTreg分化并且减少细胞毒性(CD8+)细胞增殖和浸润。通过Ab1或相关抗体抑制TGFβ将减轻如上所述的免疫抑制肿瘤微环境,以为癌症患者带来阳性结局。

[0081] 此外,诸位发明人已经发现,通过减轻免疫抑制肿瘤微环境,Ab1和相关抗体可以允许检查点调节剂(如抗PD-1抗体)更好地诱导免疫应答。因此,更多的患者可以受益于如抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2治疗等免疫疗法。

[0082] 在有或没有靶向免疫检查点分子的治疗剂的情况下,Ab1和相关抗体也可以与其他癌症疗法(如化学疗法(例如,基于铂或紫杉烷的疗法))、放射疗法和靶向癌症抗原或致癌驱动因子的疗法配合使用。

[0083] 可以通过涉及Ab1或相关抗体和如抗PD-1抗体等免疫检查点抑制剂的组合治疗的

癌症包括上述小节中所列出的癌症。

[0084] 在一些实施方案中,所述癌症对于先前的抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2疗法来说是难治性的,如晚期或转移黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌、头颈部鳞状细胞癌和霍奇金淋巴瘤。难治性患者是在开始治疗的12周内疾病进展得到确认(例如,在放射学上)、但没有任何证据表明有应答的患者。

[0085] 在一些实施方案中,Ab1或相关抗体可以与如抗PD-1疗法等另一种癌症疗法配合使用以治疗间充质癌症,如结直肠癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌、肾细胞癌、肝细胞癌和皮肤鳞状细胞癌。还参见以上讨论。

[0086] 抗PD-1抗体的例子是纳武单抗、派姆单抗、匹地利珠单抗、MEDI0608(曾用名AMP-514;参见例如,WO 2012/145493和美国专利9,205,148)、PDR001(参见例如,WO 2015/112900)、PF-06801591(参见例如,WO 2016/092419)和BGB-A317(参见例如,WO 2015/035606)。在一些实施方案中,所述抗PD-1抗体是在WO 2015/112800中披露的那些(如在所述PCT公开的表1中被称为H1M7789N、H1M7799N、H1M7800N、H2M7780N、H2M7788N、H2M7790N、H2M7791N、H2M7794N、H2M7795N、H2M7796N、H2M7798N、H4H9019P、H4xH9034P2、H4xH9035P2、H4xH9037P2、H4xH9045P2、H4xH9048P2、H4H9057P2、H4H9068P2、H4xH9119P2、H4xH9120P2、H4xH9128P2、H4xH9135P2、H4xH9145P2、H4xH8992P、H4xH8999P和H4xH9008P的那些,和在所述PCT公开的表3中被称为H4H7798N、H4H7795N2、H4H9008P和H4H9048P2的那些)。将WO 2015/112800的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0087] 例如,WO 2015/112800中披露的抗体和相关抗体(包括具有在所述PCT公开中披露的CDR、VH和VL序列或重链和轻链序列的抗体和抗原结合片段)以及结合至与所述PCT公开中披露的抗体相同的PD-1表位的抗体和抗原结合片段可以与本公开文本的Ab1或相关抗体联合使用以治疗癌症。在相关实施方案中,有用的抗PD-1抗体可以包含分别以如下SEQ ID NO:9和10所示的重链和轻链氨基酸序列;在SEQ ID NO:9和10中的VH和VL序列(以斜体示出)或在SEQ ID NO:9和10中的一个或多个(例如,全部六个)CDR(以方框示出)。

EVQLLESGGV LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NFGMTWVRQA PGKGLEWVSG ISGGGRDTYF
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLKGED TAVYYCVKWG NIYFDYWGQG TLVTVSSAST
KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV
SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV
SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO:9)

DIQMTQSPSS LSASVGDSIT ITCRASLSIN TFLNWYQQKP GKAPNLLIYA ASSLHGGVPS
RFSGSGSGTD FTLTIRTLQP EDFATYYCQQ SSNTPFTFGP GTVVDFRRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO:10)

[0088] 在其他相关实施方案中,有用的抗PD-1抗体可以包含分别以如下SEQ ID NO:11和12所示的重链和轻链氨基酸序列;在SEQ ID NO:11和12中的VH和VL序列(以斜体示出)或在SEQ ID NO:11和12中的一个或多个(例如,全部六个)CDR(以方框示出)。在相关实施方案中,有用的抗PD-1抗体可以包含分别以如下SEQ ID NO:11和12所示的重链和轻链氨基酸序列;在SEQ ID NO:11和12中的VH和VL序列(以斜体示出)或在SEQ ID NO:9和10中的一个或多个(例如,全部六个)CDR(以方框示出)。

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY
ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT
KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 12)

[0089] 在一些实施方案中,本公开文本的抗体(如抗PD-1抗体)在重链中没有C末端赖氨酸。C末端赖氨酸可以在制造期间或通过重组技术移除(即,重链的编码序列不包含C末端赖氨酸的密码子)。因此,在本发明中还设想了包含没有C末端赖氨酸的SEQ ID NO:3的重链氨基酸序列的抗体。

D.治疗功效的生物标记物

[0090] Ab1和相关抗体的功效可以通过生物标记物或靶标占有率来确定。例如,在肿瘤组织中,靶标占有率可以通过使用Meso Scale Discovery(MSD)测定评价活检中的活性TGFβ的水平来测定。在血液中,靶标接合可以通过评价减少的循环TGFβ对外周血单个核细胞(如淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞))和单核细胞的作用来测定。例如,循环CD8+T细胞的增殖增加可以在流式细胞术中使用$CD45^+RO^+CCR7^+CD28^+Ki67^+$作为标记物进行评价。循环NK细胞的激活可以在流式细胞术中使用CD3-CD56高/暗$CD16^+$或$CD137^+$作为标记物进行评价。另外,Ki-67、PD-1和ICOS可以用作与T细胞激活相关的PD标记物。

[0091] 在通过Ab1或相关抗体治疗后的免疫调节可以通过使用例如NeoGenomics平台通过多重免疫组织化学(IHC)测定评价浸润免疫细胞和免疫标记物的变化来测定。具体地,NeoGenomic的MultiOmyx TIL Panel对一组免疫标记物进行染色,从而允许定量确定各种免疫细胞的密度和定位。免疫标记物可以指示:iTreg的分化;$CD8^+$T细胞的浸润和增殖;和由$CD8^+$T细胞产生IFNγ。已经显示,Ab1抑制$CD4^+$T细胞分化为iTreg(参见例如,美国专利公开号US2018/0244763中的实施例3)并且增加$CD8^+$T细胞增殖和其IFNγ产生(如混合淋巴细胞反应测定中显示的;数据未示出)。因此,通过Ab1或相关抗体治疗的功效可以通过以下来指示:iTreg的抑制、诱导$CD8^+$T细胞增殖和向肿瘤或其他患病组织浸润、IFNγ产生增加和/或$CD8^+$T细胞与Treg细胞的比率增加。通过Ab1或相关抗体治疗后的免疫调节也可以在外周血中通过对$CD8^+$T细胞、Treg细胞、NK细胞和其他免疫细胞进行基于甲基化PCR的定量免疫细胞计数来测定。治疗功效可以临床表现为疾病进展(如肿瘤进展)的延迟或逆转。

[0092] 除非本文另外定义,否则结合本公开文本所用的科学和技术术语应当具有本领域普通技术人员通常理解的含义。下文描述了示例性方法和材料,但在本公开文本的实践或测试中也可以使用与本文所述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料。在矛盾的情况下,应以包括定义在内的本说明书为准。通常,本文描述的与神经病学、医学、药物和药物化学的技术以及细胞生物学结合使用的命名法是本领域熟知且常用的那些。酶促反应和纯化技术是根据制造商的说明书来进行的,如本领域通常所实现的或如本文所述的。进一步地,除非上下文另有要求,否则单数术语应当包括复数,并且复数术语应当包括单数。在整个本

说明书和实施方案中,词语“具有”(have)和“包括”(comprise)或变体如“具有”(has)、“具有”(having)、“包括”(comprises)或“包括”(comprising)将被理解为暗示包括所述整数或整数组,但是不排除任何其他整数或整数组。将本文提及的所有出版物和其他参考文献均通过引用以其整体并入。尽管本文引用了许多文件,但此引用并不意味着承认这些文件中的任一个构成本领域公知常识的一部分。如本文所用,如应用于一个或多个目的值的术语“大约”或“约”是指与所述的参考值类似的值。在某些实施方案中,除非另有说明或另外从上下文显而易见,所述术语是指落入所陈述的参考值的任一方向(大于或小于)的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少内的值的范围。

[0093] 为了可以更好地理解本发明,列出了以下实施例。这些实施例仅用于说明目的,并且不被解释为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0094] 以下实施例描述了评价Ab1的各种配制品以便获得具有最佳生物活性和长期稳定性的配置品的研究。评价了在冷藏储存条件、加速储存条件和应力储存条件期间缓冲液身份和pH对Ab1液体配制品的物理和化学稳定性的影响。选择了添加和不添加氯化钠的乙酸盐缓冲液体系和组氨酸缓冲液体系用于此研究。

[0095] 评估了在各种储存温度、冷冻-解冻循环和搅拌诱导应力下稳定Ab1液体配制品所需的聚山梨醇酯80(PS80)的最佳浓度。

[0096] 还评价了在室温下在静脉内(IV)输注袋中稀释和孵育多达48小时之后Ab1药物产品(DP)的物理稳定性。将DP稀释至0.5mg/ml和1.0mg/ml。在以下袋组合中评价两种浓度:含盐水的聚氯乙烯(PVC)袋、含盐水的聚烯烃(PO)袋、含葡萄糖的PVC袋和含葡萄糖的PO袋。还检查了液体DP中的最佳PS80浓度在稀释后保护Ab1的能力。

[0097] 进一步检查了过渡金属对蛋白质的化学和物理稳定性的影响。过渡金属有时会在制造期间渗入药物物质(DS)中。评价了EDTA和DTPA在一组最坏情况的实验期间螯合和保护蛋白质的能力。

[0098] 为了确保所提出的目标配制品基质足以稳定高浓度DS和较低浓度DP溶液,我们评估了在冷冻-解冻循环期间和在冷冻和液体储存条件下以及跨所有赋形剂(包括API)的浓度范围的溶液稳定性。

[0099] 实验所用的材料和方法如下。

药物物质

[0100] 使用超滤/渗滤方法(UFDF)制备了高浓度Ab1药物物质(DS)。DS浓度通常制备为高达180mg/ml。使用来自UFDF模拟器的结果对可能会在UF处理步骤期间由于Donnan效应而积聚或耗尽的缓冲盐进行浓度校正。在将配制品药物产品(DP)样品配制成目标蛋白质和赋形剂浓度后,在无菌填充前用0.22μm过滤器在层流下对配制品进行纯化。

可见颗粒的检视

[0101] 在目视检查单元下分析可见颗粒。在检视之前用拭镜纸清洁DP小瓶以去除外表面上的灰尘和指纹。

pH

[0102] 使用Thermo-Scientific™ pH探针测量计测量缓冲液和所配制的mAb溶液的pH。当重复测量之间的差在0.1pH单位之内时,结果被认为是可比较的。

同渗重摩

[0103] 使用冰点降低渗压计(Advanced Instruments,OsmoPRO)对20μL样品(n=2或3)进行同渗重摩测量。在样品分析之前和之后运行同渗重摩标准以确保测量准确性。

总蛋白质浓度

[0104] 通过使用来自C technologies的SoloVPE系统的可变路径长度技术测量280nm处的紫外线(UV)吸光度来确定总蛋白质浓度。对20μL的样品(n=2或3)进行测量。还通过在来自Unchained Labs的Big Lunatic系统的微流体芯片上测量280nm处的UV吸光度来确定总蛋白质浓度。对2至5μL的样品一式两份地进行测量。

针对构象稳定性和热稳定性的DSC

[0105] 在Malvern Microcal热量计上以0.5℃/min的加热速率从15℃升温至105℃来进行差示扫描量热法(DSC)。在1mg/ml蛋白质浓度下测量蛋白质溶液。使用OriginPro软件进行分析和热去折叠温度(T_m)确定。

溶液浊度和光学密度

[0106] 通过在来自Molecular Devices的SpectraMax® i3微板阅读器上测量从340至360nm的光学密度(OD)来定量样品浊度。对于每个样品,将200μL装载到UV-Vis透明96孔板上。OD被确定为340nm、345nm、350nm、355nm和360nm处的吸光度值的平均值。

高分子量种类的尺寸排阻HPLC

[0107] 通过尺寸排阻色谱法(SEC)对蛋白质聚集体(高分子量种类或HMWS)进行分析。将样品在配备有TSK-GEL®G3000SWXL(Tosoh Bioscience,日本东京)分析柱和匹配保护柱的1260系列HPLC(Agilent,加利福尼亚州圣克拉拉)上运行。所使用的流动相是40mM磷酸盐和150mM氯化钠(pH 7.2),且流速为0.5mL/min,持续30分钟。每个样品进行三次进样。通过280nm处的UV吸光度进行检测,并对色谱峰进行积分,以确定每个经洗脱种类的相对百分比。

显微镜下可见颗粒的微血流成像(MFI)

[0108] 使用Protein Simple MFI™型号DPA-4200分析显微镜下可见颗粒。用经0.22μm过滤和脱气的MilliQ®水大量冲洗系统,然后测量2、10和25μm标准品。使用1mL方法以0.17mL/min的流速运行样品(n=1或2)。当样品流经流动池时,光源照亮样品,并且相机在样品经过流动池时迅速捕捉图像。由MFI™软件鉴定颗粒,然后计算出每个单独颗粒的尺寸、透明度和形态。

显微镜下可见颗粒的高准确度液体颗粒计数器

[0109] 还在Hach®高准确度(HIAC)液体颗粒计数器型号9703+上通过光遮蔽测量显微镜下可见颗粒。用经0.22μm过滤和脱气的MilliQ®水冲洗系统,直到颗粒计数低于20个颗粒/mL为止。测量2μm、10μm和25μm标准品以确保准确的颗粒计数,然后进行大量洗涤以去除任何背景。使用1mL方案(进样五次,每次0.2mL),对样品进行测量。忽略第一次样品测量结果,并求取之后的四个样品测量结果的平均值。

电荷变体的毛细管等电聚焦

[0110] 使用来自ProteinSimple的iCE3仪器,通过280nm处的UV吸收经由毛细管等电聚焦(cIEF)测量蛋白质电荷异质性。将样品(1mL)和标准溶液在水中稀释至2.5mg/ml。在分析之前,使用板上混合将样品和主混合物混合。样品的等电聚焦包括在1500V下为时1分钟的预

聚焦、然后在3000V下聚焦超过10分钟。检测涵盖5次曝光,并且每个配制品的样品装载持续55秒。当差等于或小于10%时,结果被认为是可比较的。

通过LC-MS进行PTM定量

[0111] 将蛋白质样品稀释至2mg/ml,涡旋,并将40μg的蛋白质用于自动化消化。消化缓冲液是25mM Tris(pH 8.5)。对于每个样品,将15μL的消化物(含有约5μg的蛋白质)进样到C18柱上以进行LC-MS分析。在Q Exactive™上使用DDA top 8LC-MS/MS方法分析样品。

[0112] 由WLSD58服务器上的BioPharma Finder™3.0处理在Q Exactive™上获得的LC-MS/MS数据,以用于鉴定和相对定量修饰,所述修饰包括Met/Trp氧化、脱酰胺化、Asp异构化和HC C末端修饰。对于无法生成良好的MS/MS谱以通过BioPharma Finder™进行鉴定的低水平修饰,使用仅MS肽图谱进行肽分配。然后使用Progenesis处理所有数据,在保留时间比对和峰拣选之后,提供肽丰度。当Progenesis不能正确执行这一任务时,对于一些脱酰胺化和异构化的肽,需要手动调整峰拣选。

效力

[0113] 当TGF-β与水貂肺细胞一起孵育时,它抑制细胞增殖。Ab1是抗TGFβ抗体,其在与TGF-β结合时抑制TGF-β与TGF-β细胞表面受体结合,从而允许细胞增殖。在Ab1效力测定中,将不同水平的Ab1与TGF-β2一起孵育,然后添加至水貂肺细胞。

[0114] 将细胞与Ab1和TGF-β2一起孵育三天,然后添加PrestoBlue™试剂。PrestoBlue™含有细胞可渗透的非荧光化合物刃天青,刃天青会被活细胞代谢和还原,从而产生荧光产物试卤灵。因此,细胞增殖与荧光信号的强度直接相关。在添加PrestoBlue™后五个小时,使用读板仪测量荧光。生物测定软件进行Log_{10}转化并拟合为四参数模型。在参考和样品曲线被确定为合适之后,对曲线进行约束,并将测定的最终结果确定为参考的EC_{50}与测试样品的EC_{50}的比率并且以相对效力百分比(RP%)为单位进行报告。

实施例1:缓冲液和pH筛选

[0115] 此实施例描述了其中对各种缓冲液和pH条件进行筛选以鉴定Ab1的合适配制品的实验。因为液体药物产品更便于制备以及在临床环境和家庭环境两者中施用(与冻干药物产物相比),所以对各种液体水性缓冲液进行测试。表1表示此研究中使用的配制品条件和样品代码。

表1缓冲液条件

参考	条件	Ab1(mg/ml)
乙酸盐_4.7	pH 4.7,20mM乙酸盐	80
乙酸盐_5.0	pH 5.0,20mM乙酸盐	80
乙酸盐_5.3	pH 5.3,20mM乙酸盐	80
乙酸盐_5.5	pH 5.5,20mM乙酸盐	80
乙酸盐-NaCl_5.5	pH 5.5,20mM乙酸盐,25mM NaCl	80
组氨酸-NaCl_5.5	pH 5.5,10mM组氨酸,25mM NaCl	80
组氨酸_5.5	pH 5.5,10mM组氨酸	80
组氨酸_6.0	pH 6.0,10mM组氨酸	80
组氨酸_6.5	pH 6.5,10mM组氨酸	80

[0116] 乳光是有吸引力的蛋白质间相互作用的目视表现。目视观察到,Ab1配制品展现出

显著的pH依赖性乳光(图1)。低于pH 5.3时,溶液大部分澄清透明,但在pH>5.3时,乳光随pH增加而增加。乙酸盐配制品的乳光通常低于组氨酸配制品的乳光(图1)。这些目视外观图像表明,使用乙酸盐作为缓冲种类的最佳配制品pH范围为4.7-5.0。

[0117] 在5℃和25℃下储存长达4周后,表1中的溶液显示出高分子量种类(HMWS)%无显著变化。然而,在40℃下储存4周后,所有配制品的HMWS%增加约0.5%。考虑到应力条件,这种变化不是特别显著。此外,向配制品添加氯化钠对蛋白质聚集程度和HMWS%没有显著影响。

[0118] 关于显微镜下可见颗粒,HIAC微粒计数显示出显微镜下可见颗粒生长对缓冲液种类的身份和溶液pH敏感(图2A-图2C)。与任何其他pH的乙酸盐配制品和所研究的所有组氨酸配制品相比,缓冲至pH 4.7和5.0的乙酸盐配制品使得随时间产生的颗粒数量最小。然而,对于任何条件,温度对颗粒生长没有可辨别或明显的作用。

[0119] 在40℃下,对于任何给定pH,在添加或没有添加氯化钠的情况下,乙酸盐配制品和组氨酸配制品的粘度在T_0时和在4周后是可比较的(图3)。测得的粘度值均在2-3cP内,这远低于在向患者施用DP期间或在制造过程期间可能会面临挑战的任何限制。粘度值也没有显著变化,这表明所测试的配制品没有经历显著的化学降解。在四周时期内,在三个温度下储存之后,任何配制品的pH值也没有显著变化(图4A和图4B)。这些结果表明,乙酸盐和组氨酸没有经历任何显著的化学降解并且甚至在40℃下应力储存长达4周后也维持它们缓冲的能力。

[0120] 进行板UV测量,以追踪可能随时间出现的浊度和乳光的任何变化(图5)。采用分光光度法检测到先前在目视检查期间在T_0时观察到的相同的pH依赖性乳光。测得的OD值随pH增加而增加,其中组氨酸配制品比乙酸盐配制品更浑浊。在25℃和40℃下储存4周后,大多数配制品的OD都略微增加。OD随时间增加是由于显微镜下可见颗粒的形成所致。这些结果证实了,4.7-5.0左右的pH产生最少量的显微镜下可见颗粒。

[0121] 将仅缓冲液的同渗重摩值和缓冲的蛋白质溶液的同渗重摩值进行比较(表2)。与组氨酸相比,乙酸盐配制品的同渗重摩略高。添加蛋白质增加了所有配制品的同渗重摩。考虑到DP仅在稀释至IV输注袋中之后施用,同渗重摩值全部都是合理的。

表2仅缓冲液和缓冲的Ab1溶液的同渗重摩值

样品	同渗重摩(mOsmo/kg)	
	仅缓冲液(一式两份)	80 mg/ml Ab1
乙酸盐_4.7	24.5	92
乙酸盐_5.0	28	40
乙酸盐_5.5	32	46
乙酸盐-NaCl_5.5	79.5	101
组氨酸-NaCl_5.5	71.5	74
组氨酸_5.5	13.5	26
组氨酸_6.0	11.5	21
组氨酸_6.5	9	15

[0122] 如在比较酸性同种型的量和单体百分比时所见,对于乙酸盐配制品和组氨酸配制品,Ab1的化学稳定性是类似的。在40℃下4周后,在溶液pH接近6.0和6.5时,组氨酸配制品

产生的酸性同种型的相对量略微增加。

[0123] 所有配制品具有约1.0的相同的相对效力,这表明所有配制品均是可接受的。这些效力结果与先前的聚集和HMWS%结果相符合,因为所有HMWS%值均较低(<2%),因此预期效力不会太大变化。

实施例2:表面活性剂筛选

[0124] 此实施例描述了评价向Ab1配制品添加表面活性剂聚山梨醇酯80(PS80)的实验。下表3中示出了这些实验中所使用的配制品条件和样品代码。

表3具有聚山梨醇酯80的配制品

配制品	PS80来源	参考	PS80	Ab1	缓冲液	pH
1	A	PS80_CSR_0%	0%	150 mg/ml	20 mM乙酸盐+8%蔗糖	5.0
2		PS80_CSR_0.025%	0.025%			
3		PS80_CSR_0.05%	0.05%			
4		PS80_CSR_0.1%	0.1%			
5	B	PS80_ChP_0.05%	0.05%	150 mg/ml	20 mM乙酸盐+8%蔗糖	5.0
6		PS80_ChP_0.1%	0.1%			

[0125] 对于在5℃或40℃下储存一周或剧烈搅拌48小时之后的配制品,评价所述配制品的板浊度和光学密度(OD;在340-360nm处)值。数据显示出,对于含有PS80的配制品,在5℃或40℃下储存1周之后或在剧烈搅拌48小时之后,OD值没有变化。使用两种不同商业来源的PS80(A和B),在PS80具有0.025%、0.05%和0.1%的不同浓度的情况下,也没有观察任何差别。然而,对于没有添加表面活性剂的配制品,在5℃储存和40℃储存这两种情况下,OD值确实随时间略微减小。对于无表面活性剂配制品,还观察到浊度略高。这些观察结果表明,PS80对Ab1蛋白有增溶作用。

[0126] 在不同的储存条件和界面应力条件下,通过SEC监测小可溶性聚集体的水平(图6)。储存温度仅具有微不足道的影响,并且在储存长达2周后才使得聚集增加0.5%;PS80浓度对聚集水平没有明显的作用。在-30℃与室温之间进行最坏情况的冷冻-解冻循环多达10次对蛋白质稳定性也没有负面影响(图6,右下图)。

[0127] 另一方面,剧烈搅拌或振荡对聚集有很大影响(图6,左下图)。没有添加表面活性剂的配制品在搅拌48小时后产生高达8%HMWS。这些聚集水平对表面活性剂的存在和浓度高度敏感。低至0.025%的PS80浓度足以将聚集水平降低至小于无PS80配制品的聚集水平的2%。增加PS80浓度甚至高达0.05%或0.1%进一步使HMWS%稍微降低。这些数据表明,0.05%可以用作以稳定Ab1配制品为目标的PS80浓度下限。

[0128] 以上SEC数据表明,对于此部分中所研究的大多数条件,Ab1没有高聚集风险。因此,HIAC是追踪通过SEC过滤出的较大可溶性和不溶性聚集体(这些聚集体的大小可以在显微镜下可见颗粒范围内)所需的关键测定。HIAC数据显示出,在任何给定储存或界面应力条件下,不含任何PS80的配制品产生显著更多的显微镜下可见颗粒。数据进一步显示出,PS80对Ab1配制品中的颗粒数量的减少有浓度依赖性作用。低至0.025%的PS80浓度足以开始减少颗粒计数。将PS80浓度增加至0.05%和更高持续地减少颗粒计数。

[0129] 在T_0时和在储存2周后测量配制品的pH值。在任何时间点或温度下,任何配制品都

没有显著的pH变化。PS80对配制品pH也没有浓度特异性影响。PS80的浓度没有诱导乙酸盐缓冲液维持150mg/ml Ab1配制品的pH的能力发生任何变化。

[0130] 对于此实施例中的所有研究,在任何测试条件下,未显现出PS80来源对配制品稳定性的影响。

实施例3:IV袋稀释研究

[0131] 此实施例描述了测试Ab1配制品在不同的IV袋中的稳定性的实验。下表4中示出了这些实验中所使用的配制品条件。

表4用于IV袋稀释研究的配制品和样品代码

PO				
经稀释的PS80(%)	PO_葡萄糖		PO_盐水	
	0.5 mg/ml Ab1	1.0 mg/ml Ab1	0.5 mg/ml Ab1	1.0 mg/ml Ab1
0.0010%	PO_D_0.5_a	PO_D_1.0_a	PO_S_0.5_a	PO_S_1.0_a
0.0005%	PO_D_0.5_b	PO_D_1.0_b	PO_S_0.5_b	PO_S_1.0_b
0.0003%	PO_D_0.5_c	PO_D_1.0_c	PO_S_0.5_c	PO_S_1.0_c
0.0002%	PO_D_0.5_d	PO_D_1.0_d	PO_S_0.5_d	PO_S_1.0_d
PVC				
经稀释的PS80(%)	PVC_葡萄糖		PVC_盐水	
	0.5 mg/ml Ab1	1.0 mg/ml Ab1	0.5 mg/ml Ab1	1.0 mg/ml Ab1
0.0010%	PVC_D_0.5_a	PVC_D_1.0_a	PVC_S_0.5_a	PVC_S_1.0_a
0.0005%	PVC_D_0.5_b	PVC_D_1.0_b	PVC_S_0.5_b	PVC_S_1.0_b
0.0003%	PVC_D_0.5_c	PVC_D_1.0_c	PVC_S_0.5_c	PVC_S_1.0_c
0.0002%	PVC_D_0.5_d	PVC_D_1.0_d	PVC_S_0.5_d	PVC_S_1.0_d

[0132] 在IV输注前,将DP稀释至IV袋中。在DP中没有足够浓度的表面活性剂的情况下,蛋白质分子有可能吸附在袋上,这取决于制成IV袋的材料类型。因此,IV袋中的经稀释的DP的API浓度与旨在给患者施用的剂量相比较低。

[0133] 我们追踪了稀释至用不同浓度的PS80加标和包被的袋中的Ab1的吸附行为和物理稳定性。PS80通过加标稀释至0.001%、0.0005%、0.0003%和0.0002%的浓度,以便确定起始DP配制品中所需的最佳浓度。上述PS80浓度对应于起始DP中的50-300倍稀释的PS80浓度。接着,将不含PS80的150mg/ml DP稀释至0.5或1.0mg/ml。评价将配制品稀释至IV袋材料和稀释液的以下四种不同组合中的作用:含盐水的PVC袋、含盐水的PO袋、含葡萄糖的PVC袋和含葡萄糖的PO袋。

[0134] 然后将经稀释配制品孵育,并在24和48小时之后进行测量。数据显示出,对于所研究的任何加标的表面活性剂浓度,含盐水的PO和PVC袋没有显著影响蛋白质吸附(图7A)。然而,使用葡萄糖作为稀释剂以依赖于袋材料的方式略微影响吸附。具体地,PVC葡萄糖袋组合随着PS80浓度降低而引起明显的蛋白质吸附(图7A)。结果直接影响将为施用DP提出的建议。

[0135] DP稀释后的显微镜下可见(>10μm)颗粒产生对所使用的稀释剂类型高度敏感。与基于葡萄糖的溶液相比,基于盐水的溶液产生较高水平的颗粒(图7B)。这与配制品中所使用的PS80浓度无关。0.001%PS80的显微镜下可见颗粒计数与0.003%PS80的显微镜下可见颗粒计数之间没有显著差异。IV袋的材料似乎对颗粒化没有显著影响,并且颗粒计数是可比较的。

[0136] 还评价了在葡萄糖和盐水与PO袋和PVC袋的组合中孵育之后经稀释的DP样品的聚集。与葡萄糖袋相比,稀释至盐水袋中的蛋白质产生略微更多的HMWS%。与PVC袋相比,PO袋还产生更多的聚集体。蛋白质浓度对蛋白质稳定性也有依赖性,其中与1.0mg/ml稀释度相比,0.5mg/ml稀释度通常具有较高的聚集水平。然而,PS80浓度对蛋白质稳定性没有显著影响。

实施例4:DS和DP稳定性

[0137] 此实施例描述了用于评价药物物质(DS)和药物产品(DP)的长期稳定性的研究。表5示出了所测试的配制品,其中蔗糖用作冷冻保护剂,PS80用作表面活性剂,并且DTPA用作螯合剂。

表5用于长期稳定性测试的配制品

参考号	Ab1(mg/ml)	缓冲液(pH 5.0)	蔗糖%	PS80%	DTPA(μM)
D_1	50	20mM乙酸盐	8	0.06	50
D_2	100	20mM乙酸盐	8	0.06	50
D_3	135	20mM乙酸盐	8	0.06	50
D_4	150	20mM乙酸盐	8	0.06	50
D_5	165	20mM乙酸盐	8	0.06	50

[0138] 考虑到含有50μM DTPA的20mM乙酸盐缓冲液的这些数据,确定含有25mM乙酸盐(提供相同的pH范围)和10μM EDTA的UF/DF纯化的Ab1的配制品将显示出相同的溶液行为。为此,测试了这种初步提出的DS和DP的目标配制品:25mM乙酸盐、8%蔗糖、0.06%PS80、10μM螯合剂(测试的是DTPA,但EDTA是等效的)(pH 5.0)(表5)。在储存稳定性方面,评估了此配制品基质在跨越DS和DP浓度范围的浓度下稳定Ab1的能力。在5℃或25℃下储存3个月后,在任何配制品中,HMWS%没有显著变化(图8A)。在40℃的情况下,有至多约0.5%的增加;然而,在这些类型的加速应力储存条件下,这种增加被认为是微不足道的,并反映了所提出的配制品基质优化稳定性和保质期的总体能力。

[0139] 还将Ab1配制品在-80℃下冷冻,然后在-20℃下储存。在这些条件下储存6个月后,HMWS%没有显著变化(图8B)。还通过SEC追踪低分子量种类(LMWS)%,并且在任何配制品或储存条件下没有观察到配制品显著变化。此外,对于10和25μm显微镜下可见颗粒,每个配制品的都在USP<787>规格内。

[0140] 在任何条件下,Ab1的化学稳定性也没有巨大变化。总之,所提出的配制品基质具有稳定50mg/ml的最低电位DP浓度和165mg/ml的最高电位DS浓度的范围的能力。

实施例5:金属加标研究和螯合剂相容性

[0141] 在生物制品制造期间,DS和DP中过渡金属污染的风险很低。如果有污染,过渡金属可能会导致液体溶液中的化学不稳定和聚集。此实施例描述了评价金属和螯合剂对Ab1配制品的影响的研究。表6示出了用于测试金属加标物的配制品:

表6用于金属加标研究的配制品

参考号	Ab1 (mg/ml)	缓冲液 (pH 5.0)	蔗糖%	PS80%	DTPA (μM)	Fe (ppb)	Cu (ppb)
M_1	150	20 mM乙酸盐	8	0.06	-	-	-
M_2	150	20 mM乙酸盐	8	0.06	-	-	500
M_3	150	20 mM乙酸盐	8	0.06	50	-	500
M_4	150	20 mM乙酸盐	8	0.06	-	500	-
M_5	150	20 mM乙酸盐	8	0.06	50	500	-

[0142] 如表中所示,在添加和没有添加螯合剂DTPA的情况下,将Ab1样品用铁和铜加标。在没有添加螯合剂的情况下,在铁加标的样品中有显著的M252氧化和聚集;铜加标的样品也显示出氧化和聚集增加,但程度较小(图9)。在存在DTPA的情况下,蛋白质降解大大减少。

[0143] 还测试了另一种螯合剂EDTA。将Ab1配制品的储存稳定性用10μM DTPA或10μM EDTA加标,并进行比较。数据显示出,这两种螯合剂对溶液中的蛋白质分子提供了类似的保护水平。这些螯合剂选择性地缓解金属诱导的颗粒形成或聚集。

实施例6:配制品稳健性与API和赋形剂的浓度范围

[0144] 此实施例描述了评价跨抗体以及赋形剂的浓度范围的Ab1配制品稳定性的研究。下表7中示出了用于研究的配制品。

表7用于API和赋形剂浓度范围研究的配制品

pH参考	pH	Ab1(mg/ml)	乙酸盐(mM)	蔗糖%	PS80%	DTPA(μM)
4.7_F1	4.7	40	16	9.6	0.045	50
4.7_F2	4.7	40	24	6.4	0.075	50
4.7_F3	4.7	40	24	9.6	0.060	40
4.7_F4	4.7	57.5	16	6.4	0.045	40
4.7_F5	4.7	75	16	8.0	0.075	50
4.7_F6	4.7	75	20	9.6	0.075	40
4.7_F7	4.7	75	24	6.4	0.045	45
5.0_F1	5.0	40	16	6.4	0.075	40
5.0_F2	5.0	57.5	20	8.0	0.060	45
5.0_F3	5.0	75	24	9.6	0.045	50
5.3_F1	5.3	40	16	9.6	0.075	45
5.3_F2	5.3	40	20	6.4	0.045	50
5.3_F3	5.3	40	24	8.0	0.045	40
5.3_F4	5.3	57.5	24	9.6	0.075	50
5.3_F5	5.3	75	16	6.4	0.060	50
5.3_F6	5.3	75	16	9.6	0.045	40
5.3_F7	5.3	75	24	6.4	0.075	40

[0145] 通过分析HMWS为二聚体、三聚体和四聚体的亚种来评价聚集。这允许能够追踪配制品组分的改变对聚集细节的直接影响。pH 4.7和pH 5.3是最稳定的,并且没有产生较大量的HMWS;此外,主要的HMW种类是二聚体(图10)。pH 5.0配制品产生大约多0.6%的总聚集体;二聚体水平与pH 4.7和5.3是可比较的,且0.6%主要表示三聚体种类。尽管如此,总

HMWS%水平是可接受的。

[0146] 相对于时间或储存温度,跨不同的配制品,显微镜下可见颗粒(10和25μm)的数量没有巨大变化(数据未示出)。在搅拌或冷冻-解冻循环应力之后,显微镜下可见颗粒(10和25μm)的数量也没有巨大变化(数据未示出)。

[0147] 总而言之,相对于组氨酸,乙酸盐缓冲配制品提供了最佳的物理和化学稳定性。显微镜下可见颗粒计数对缓冲液种类的身份和pH高度敏感,其中pH较低(4.7和5.0)的乙酸盐配制品产生了最低的颗粒计数。浊度和乳光也是pH依赖性的;配制品在较低pH乙酸盐条件下的乳光要少的多,这表明在较低pH下不太值得考虑蛋白质间相互作用。还显示出较少乳光的溶液在UFDF操作期间的处理时间较短,这是产生高浓度药物物质所需的重要制造考虑因素。

[0148] 需要向最终配制品添加PS80以缓解聚集、尤其是颗粒化风险,其显示出聚集和颗粒化会通过界面应力(如搅拌或冷冻/解冻循环)而加速。PS80在缓解或减少蛋白质吸附至IV输注组件(例如,IV袋)方面也是有效的。≥0.05%的PS80浓度提供了最佳稳定性。

[0149] 在加速储存条件下观察到了金属加标的样品中的显著氧化和中度聚集水平。向配制品添加金属螯合剂,以提供保护防止可能发生的电位金属诱导的蛋白质和赋形剂降解。10μM EDTA和10μM DTPA提供了可比较的保护水平,并且使得HMWS、氧化和PS80浓度的变化类似。

[0150] 发现大约相当于80mg/ml的8%蔗糖是适于保护分别为50mg/ml和150mg/ml的DP浓度和DS浓度的比率。

[0151] 来自这些稳定性研究的结果证实了目标配制品在各种储存和其他应力条件下稳定冷冻DS以及液体DP的稳健性。

实施例7:Ab1的替代配制品[用于输注用溶液的粉末]

[0152] 另外的示例性Ab1配制品是无菌冻干产品。将药物产品填充在USP 1型硼硅酸盐玻璃小瓶中,10.3mL/小瓶且过量0.3mL。将小瓶用硅化灰色丁基橡胶塞子塞住,并且用铝制密封件和翻盖密封。表8提供了关于Ab1药物产品的示例性组成的信息。

[0153] 对于施用,在22℃下将每个小瓶用9.7mL的注射用水重构,以得到在含有10mM L-组氨酸、2%(w/v)蔗糖、3.5%(w/v)甘露糖醇、10mM L-甲硫氨酸、0.01%(w/v)聚山梨醇酯80(pH 6.0)的水性溶液中25mg/mL的蛋白质浓度(表8)。

[0154] 赋形剂筛选显示出,在冷冻和解冻期间,2%蔗糖减少了聚集体的形成。填充剂甘露糖醇没有显著影响蛋白质稳定性,但是帮助产生雅致的冻干饼。

表8Ab1的替代性示例性配制品

药物产品:25mg/mL
10mM L-组氨酸HCL
2%(w/v)蔗糖
3.5%(w/v)甘露糖醇
10mM L-甲硫氨酸
0.01%PS80
pH 0.6

序列表
<110> 建新公司
<120> 抗TGF-β抗体配制品及其用途
<130> 022548.TW064
<140>
<141>
<150> 63/212,473
<151> 2021-06-18
<160> 12
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多肽
<400> 1

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                  10                  15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn
            20                  25                  30
Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
```

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽
<400> 2

Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽
<400> 3

Ser Asn Val Ile Ser

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 4

Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 5

Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 7

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro
1 5

<210> 8

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成肽
<400> 8
Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr
1 5
<210> 9
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多肽
<400> 9
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30
Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽
<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Ser Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Asn Thr Phe
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Thr Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Val Val Asp Phe Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多肽
<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽
<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

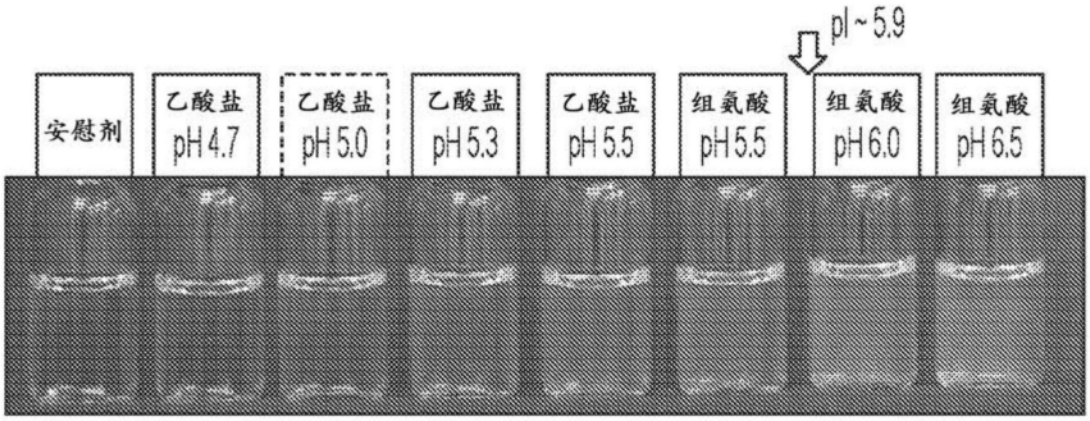

pI~5.9
安慰剂
乙酸盐 pH4.7
乙酸盐 pH5.0
乙酸盐 pH5.3
乙酸盐 pH5.5
组氨酸 pH5.5
组氨酸 pH6.0
组氨酸 pH6.5

图1

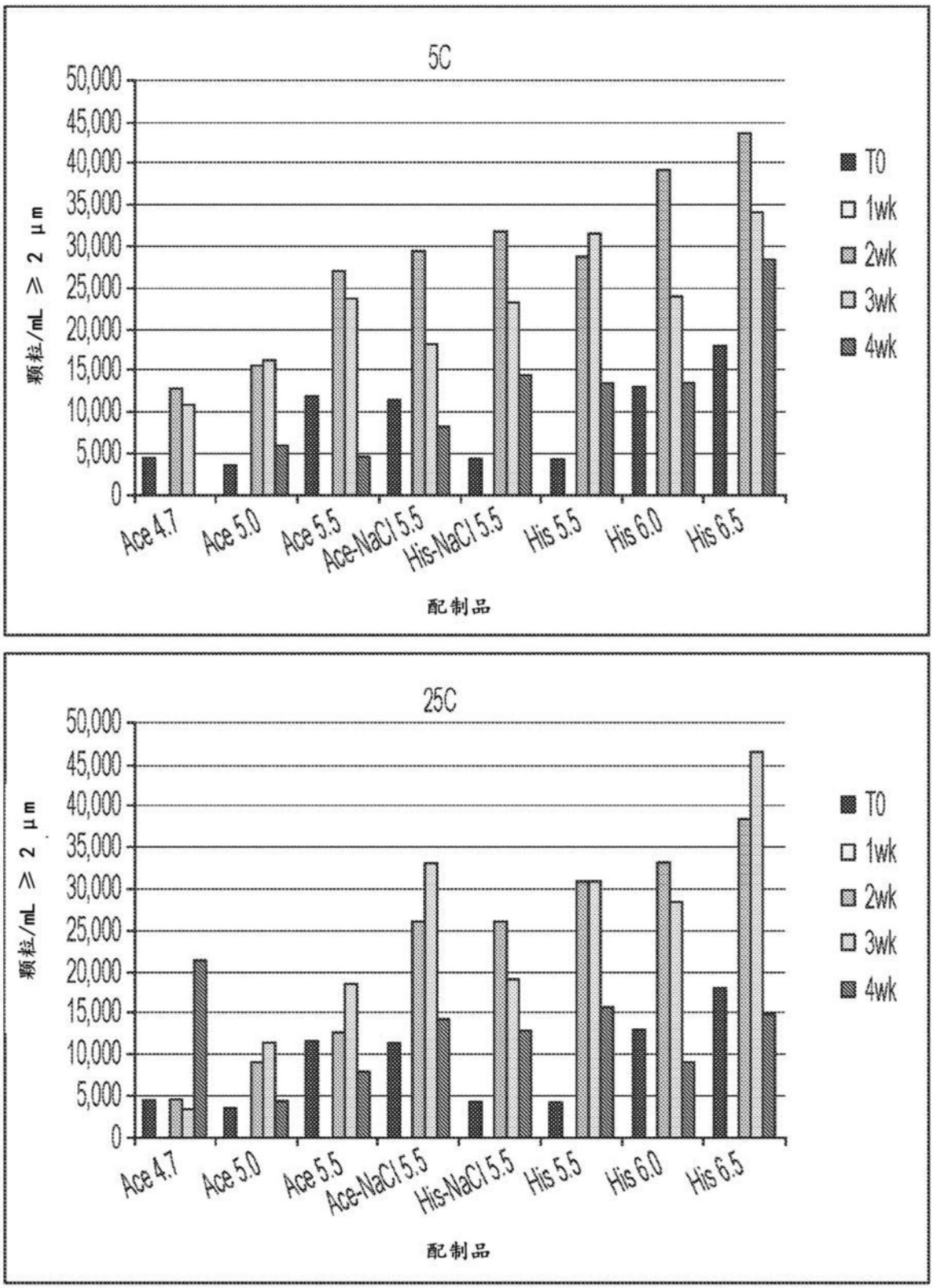

5C
50,000
45,000
40,000
35,000
30,000
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
颗粒/mL ≥ 2 μm
T0
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品
25C
50,000
45,000
40,000
35,000
30,000
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
颗粒/mL ≥ 2 μm
T0
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品

图2A

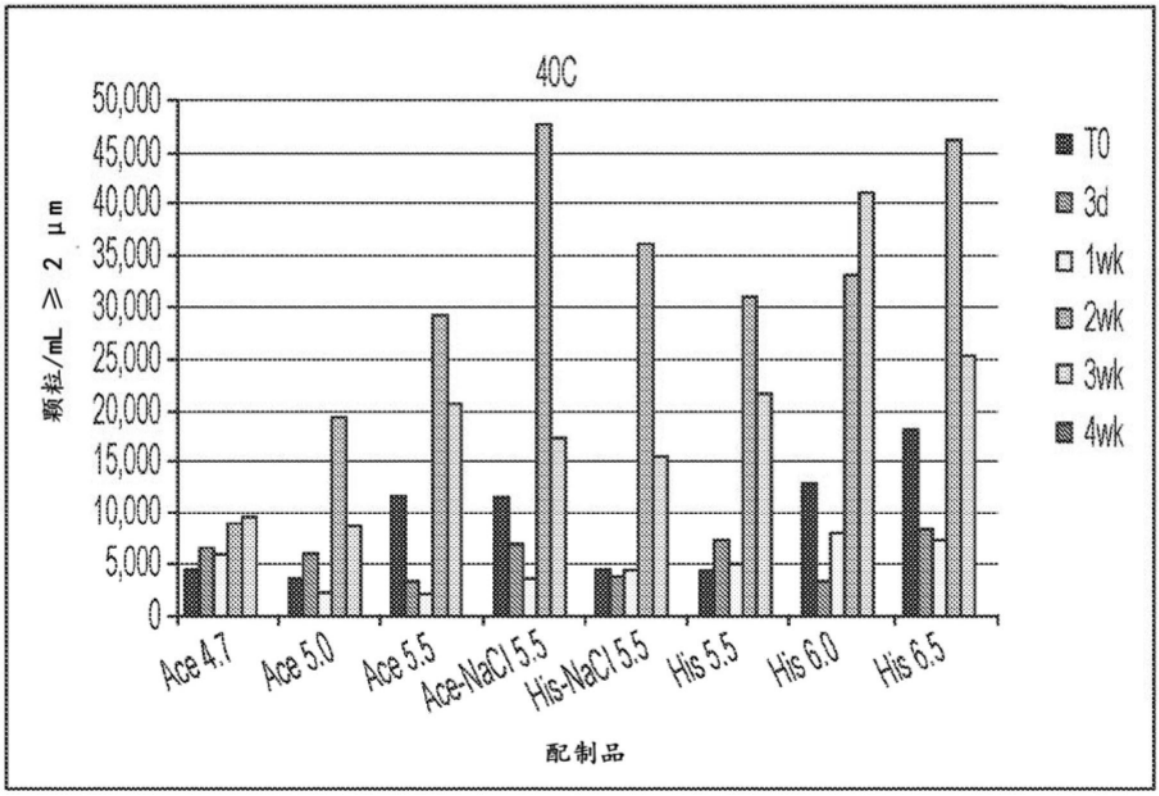

40C
50,000
45,000
40,000
35,000
30,000
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
颗粒/mL ≥ 2 μm
T0
3d
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品

图2A续

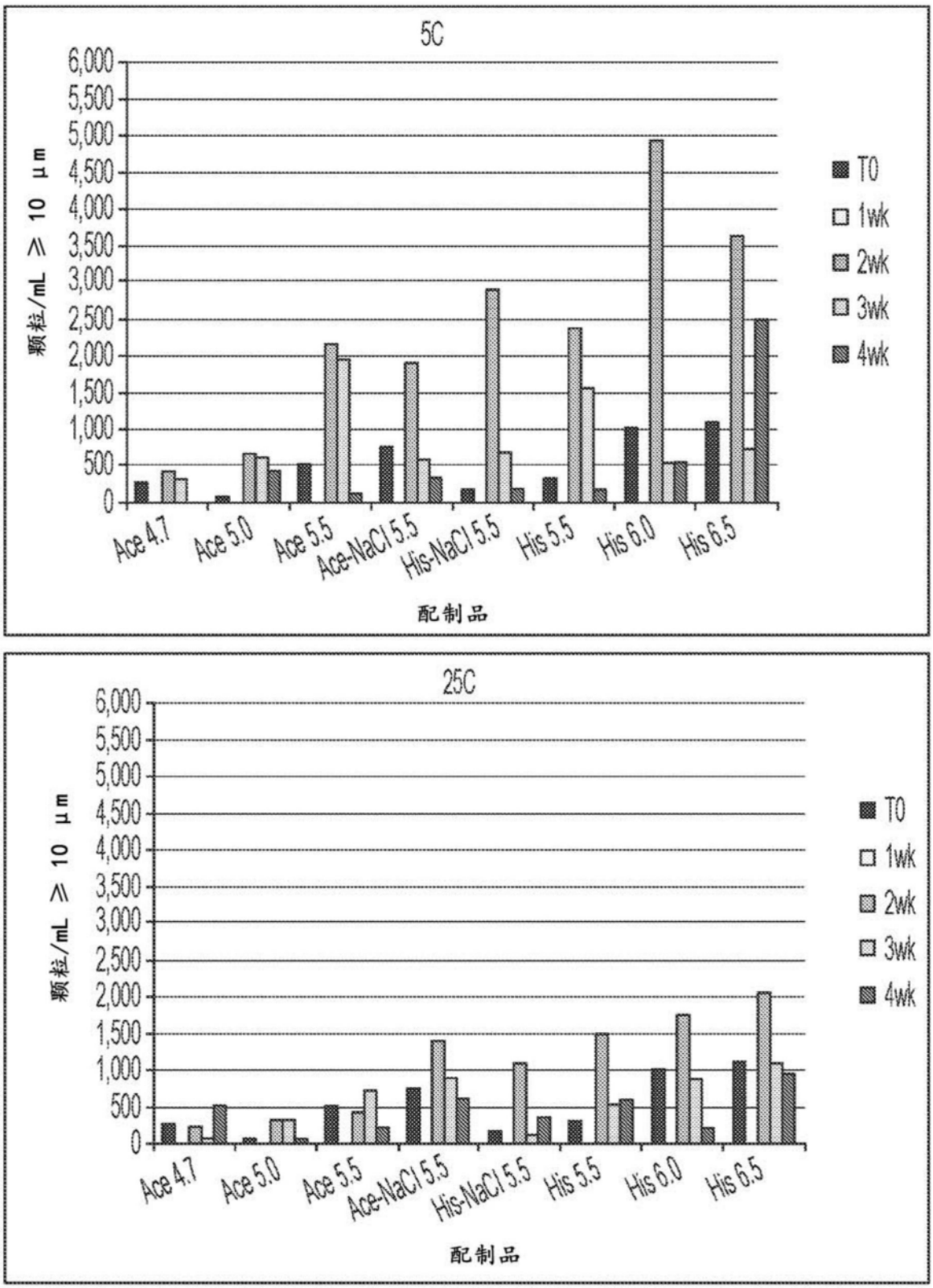

5C
颗粒/mL ≥ 10 μm
6,000
5,500
5,000
4,500
4,000
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
T0
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品
25C
颗粒/mL ≥ 10 μm
6,000
5,500
5,000
4,500
4,000
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
T0
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品

图2B

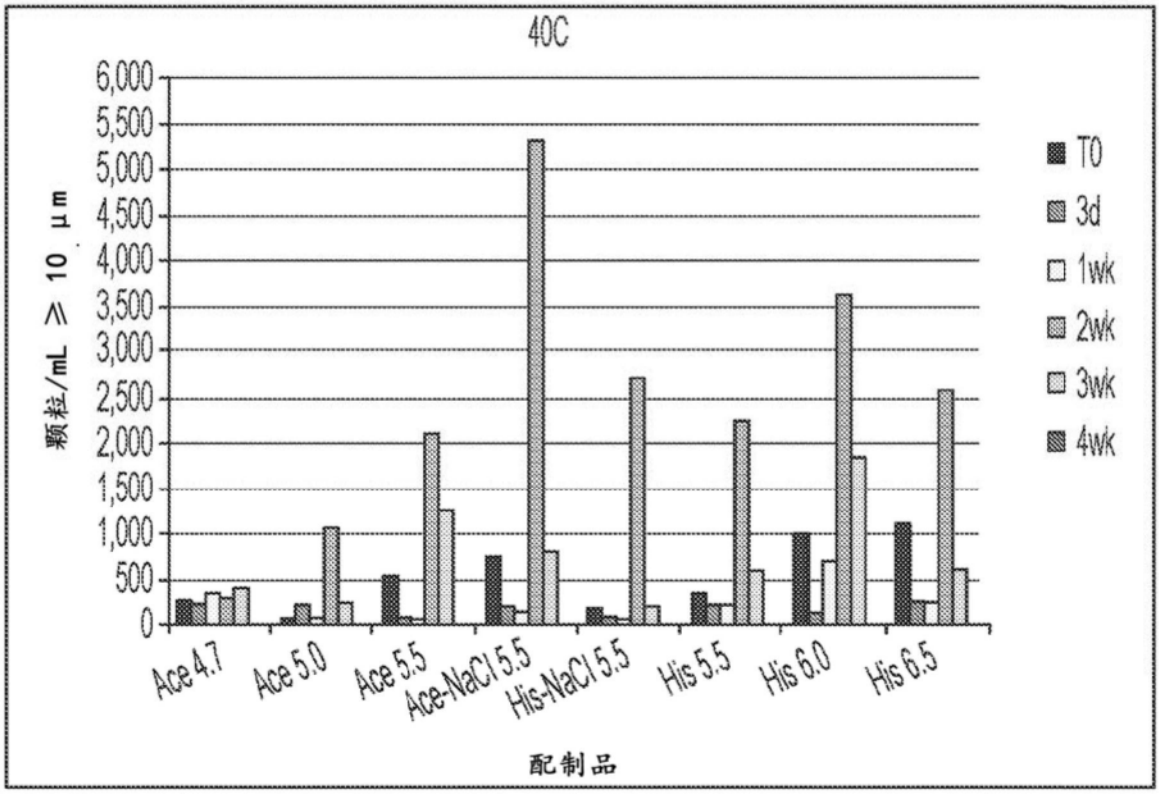

40C
6,000
5,500
5,000
4,500
4,000
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
颗粒/mL ≥ 10 μm
T0
3d
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品

图2B续

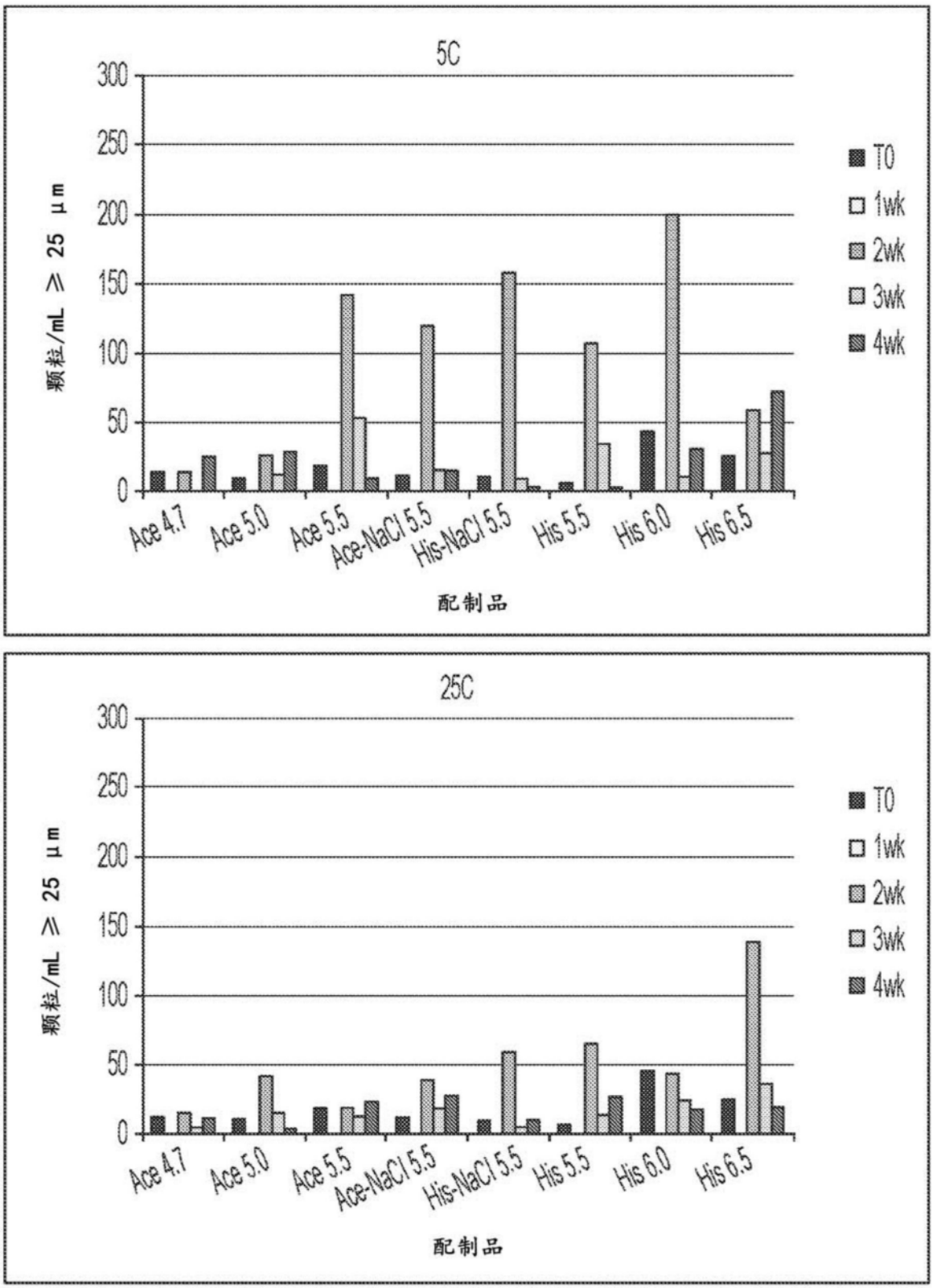

5C
300
250
200
150
100
50
0
颗粒/mL ≥ 25 μm
T0
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品
25C
300
250
200
150
100
50
0
颗粒/mL ≥ 25 μm
T0
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品

图2C

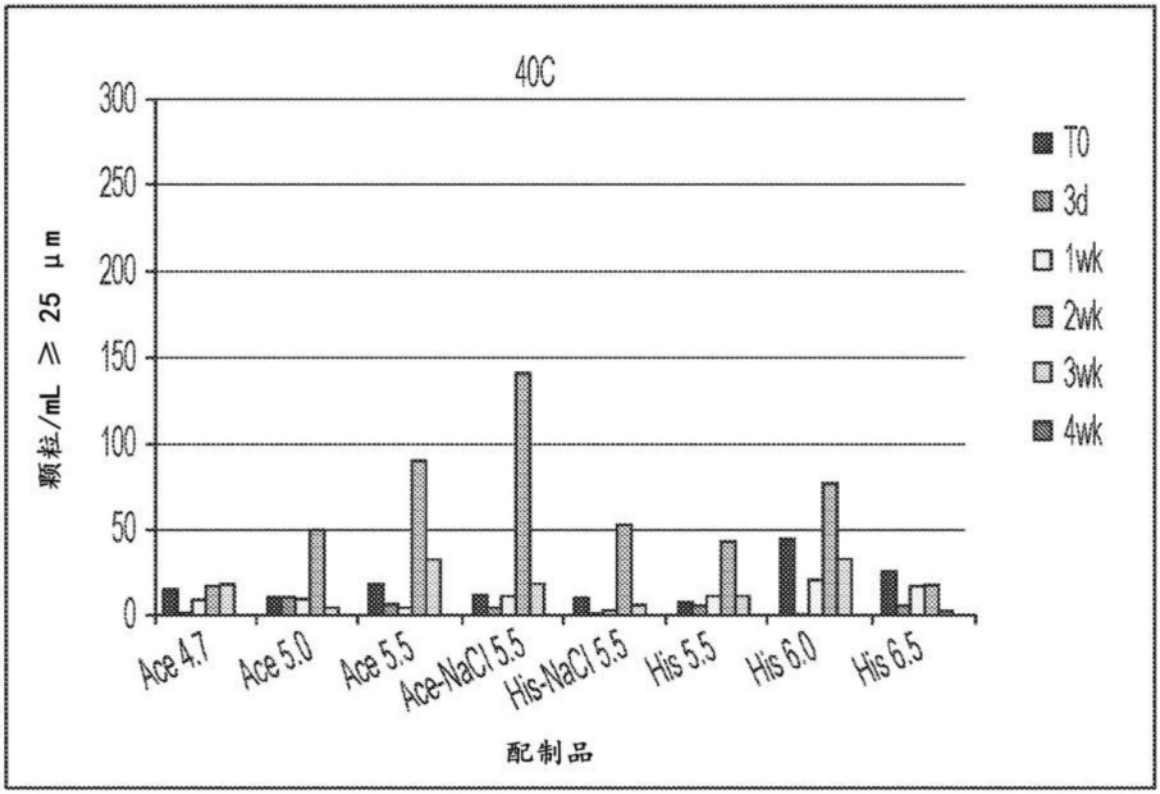

40C
300
250
200
150
100
50
0
颗粒/mL ≥ 25 μm
T0
3d
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品

图2C续

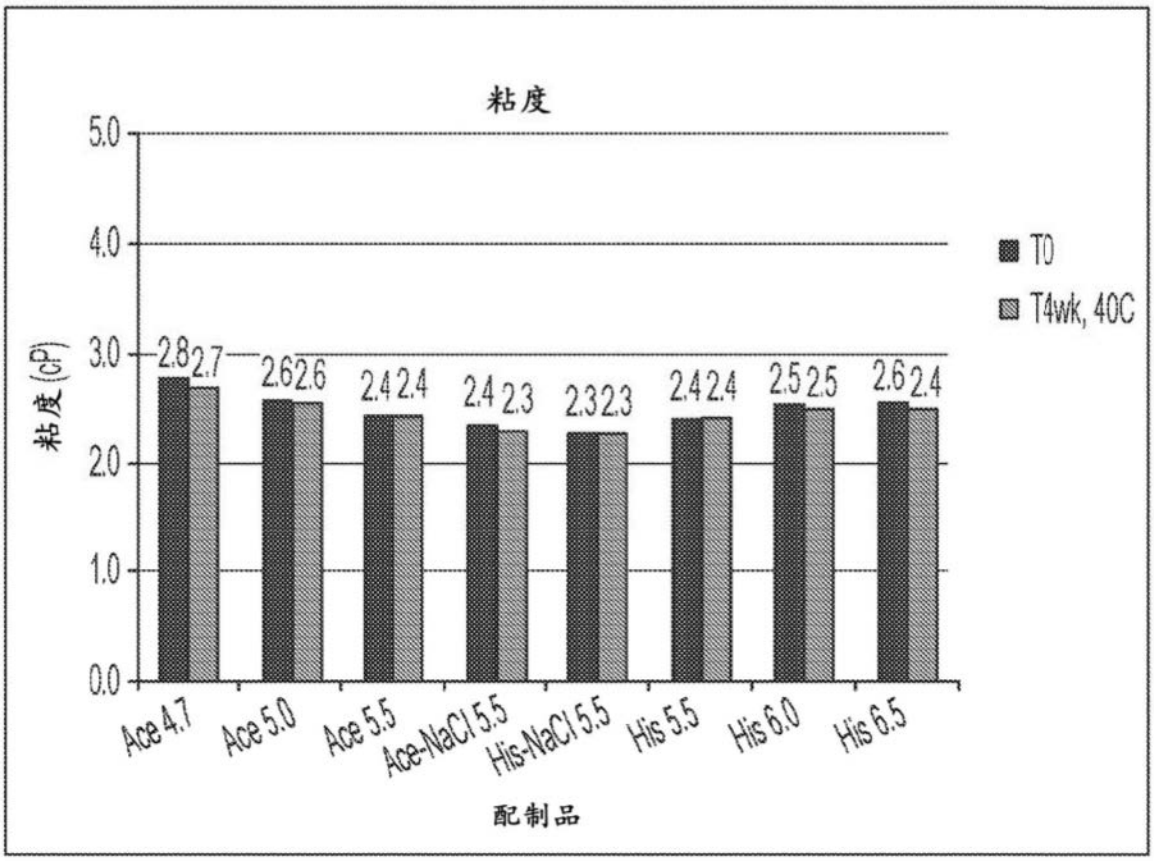

粘度
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
粘度(cP)
2.8 2.7
2.6 2.6
2.4 2.4
2.4 2.3
2.3 2.3
2.4 2.4
2.5 2.5
2.6 2.4
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品
T0
T4wk, 40C

图3

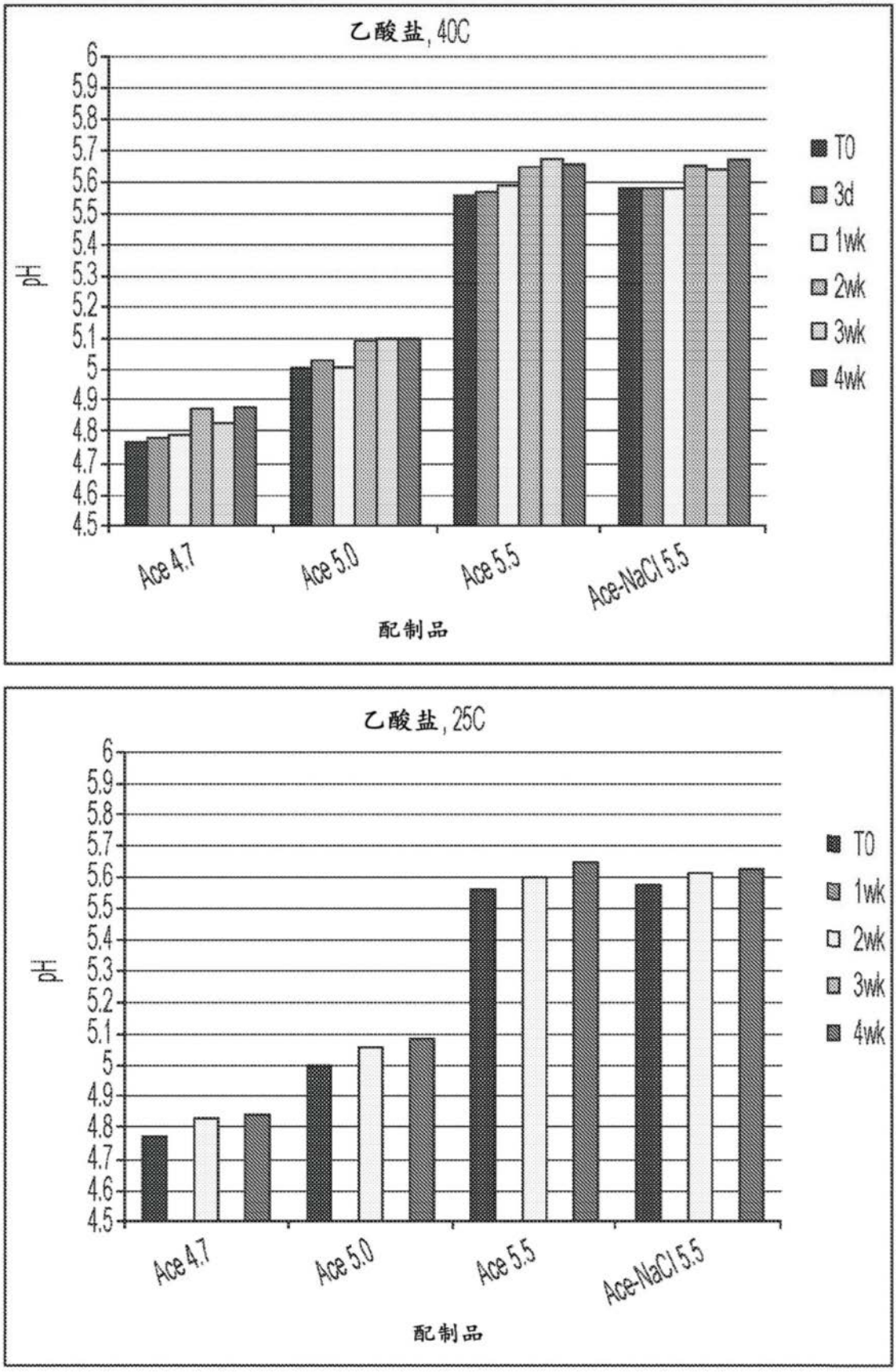

乙酸盐, 40C
pH
6
5.9
5.8
5.7
5.6
5.5
5.4
5.3
5.2
5.1
5
4.9
4.8
4.7
4.6
4.5
T0
3d
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
配制品
乙酸盐, 25C
pH
6
5.9
5.8
5.7
5.6
5.5
5.4
5.3
5.2
5.1
5
4.9
4.8
4.7
4.6
4.5
T0
1wk
2wk
3wk
4wk
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
配制品

图4A

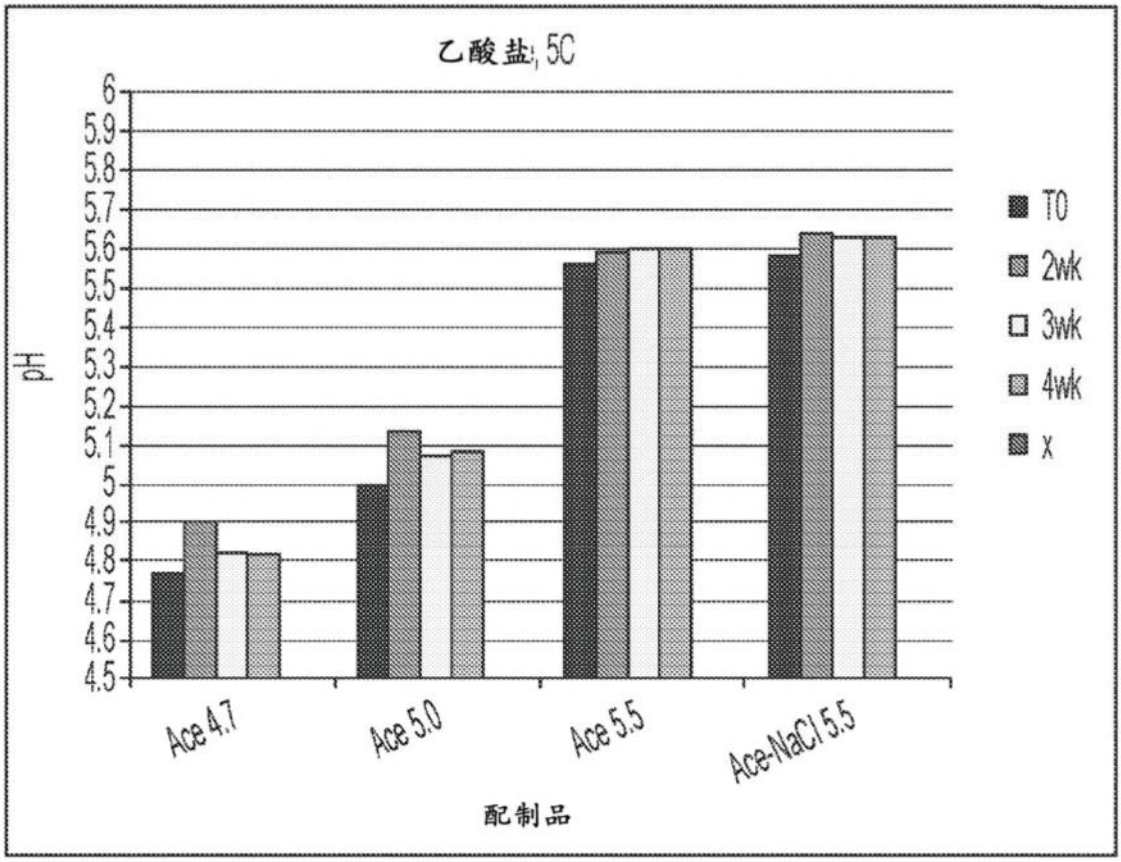

乙酸盐, 5C
pH
6
5.9
5.8
5.7
5.6
5.5
5.4
5.3
5.2
5.1
5
4.9
4.8
4.7
4.6
4.5
T0
2wk
3wk
4wk
x
Ace 4.7
Ace 5.0
Ace 5.5
Ace-NaCl 5.5
配制品

图4A续

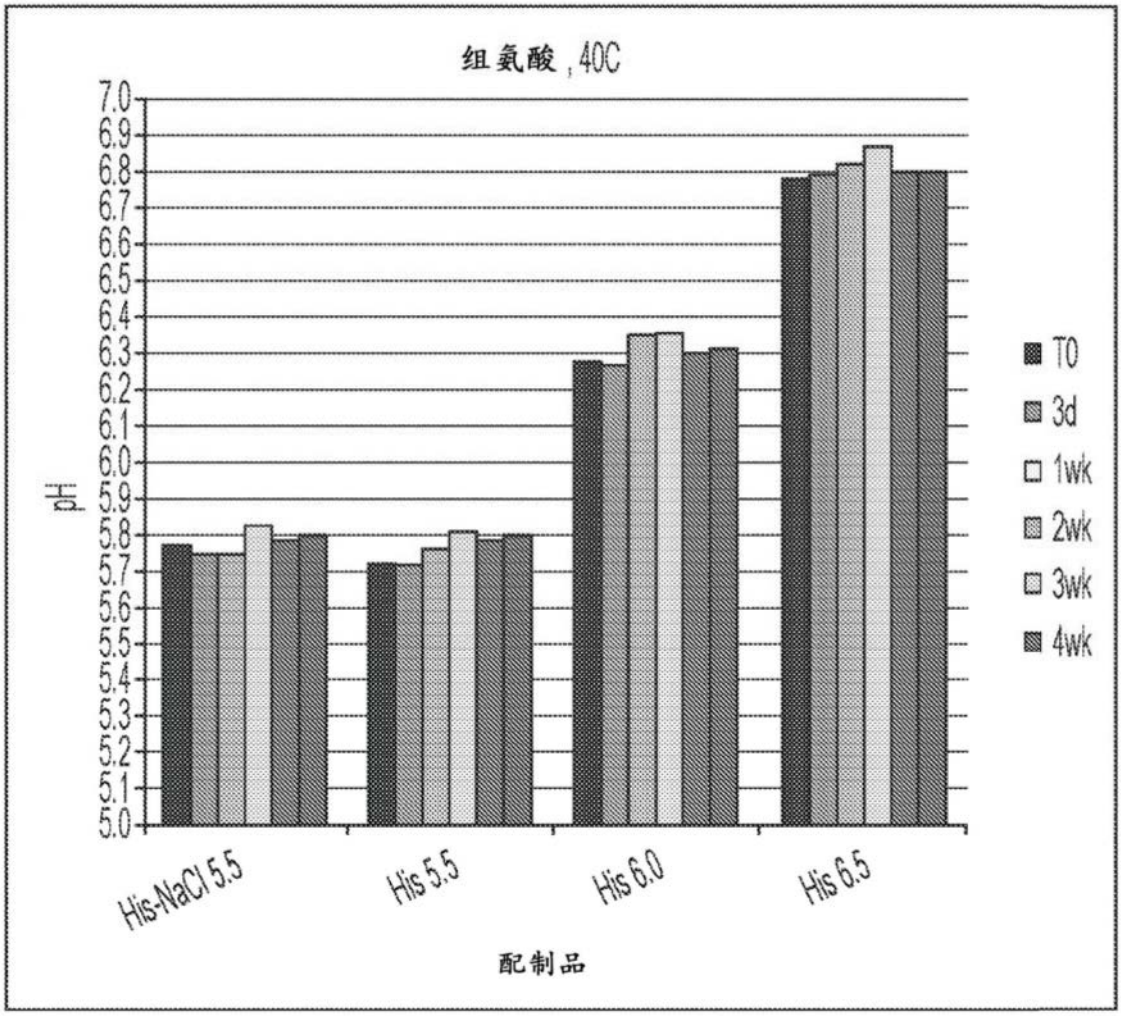

组氨酸，40C
pH
7.0
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
6.4
6.3
6.2
6.1
6.0
5.9
5.8
5.7
5.6
5.5
5.4
5.3
5.2
5.1
5.0
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品
T0
3d
1wk
2wk
3wk
4wk

图4B

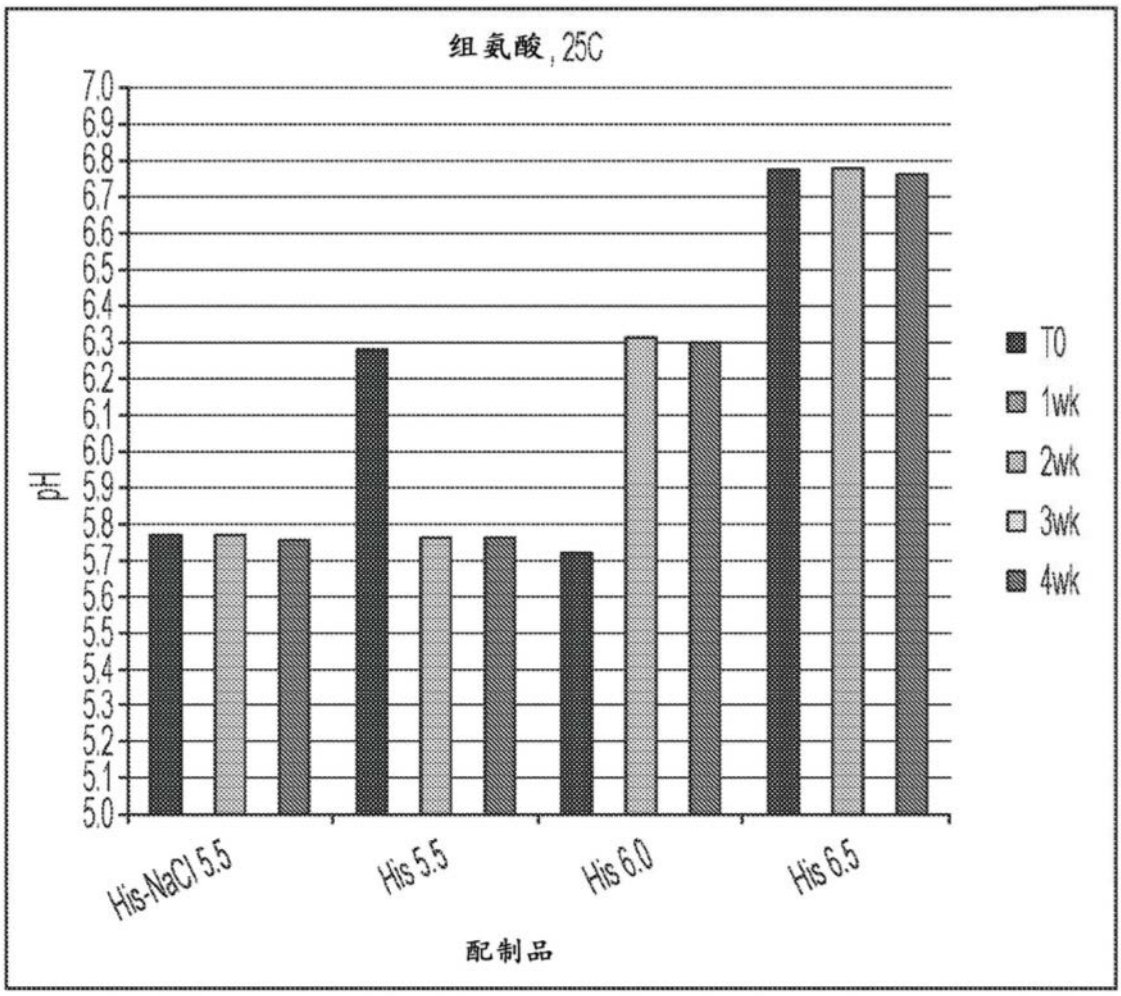

组氨酸，25C
pH
7.0
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
6.4
6.3
6.2
6.1
6.0
5.9
5.8
5.7
5.6
5.5
5.4
5.3
5.2
5.1
5.0
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品
T0
1wk
2wk
3wk
4wk

图4B续

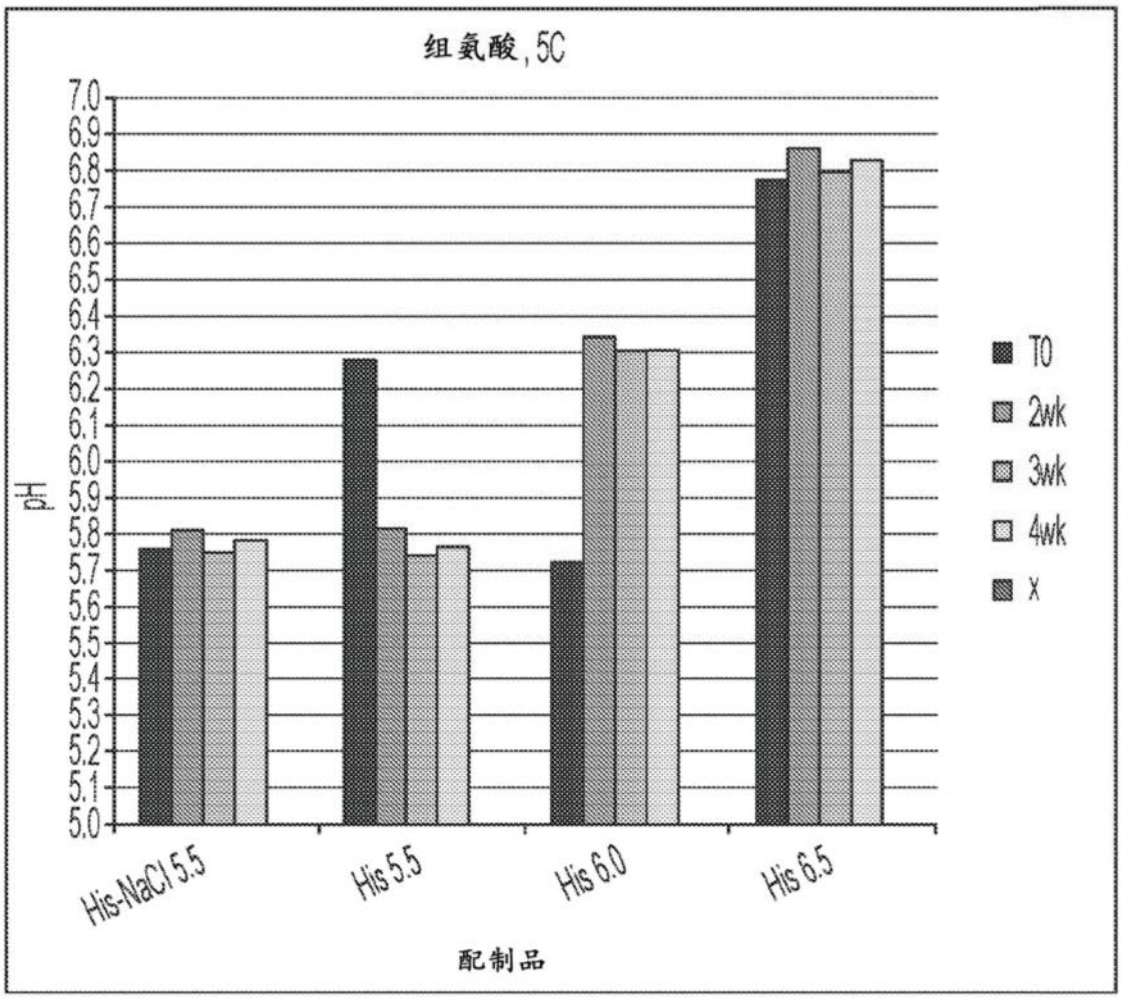

组氨酸,5C
pH
7.0
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
6.4
6.3
6.2
6.1
6.0
5.9
5.8
5.7
5.6
5.5
5.4
5.3
5.2
5.1
5.0
His-NaCl 5.5
His 5.5
His 6.0
His 6.5
配制品
T0
2wk
3wk
4wk
x

图4B续

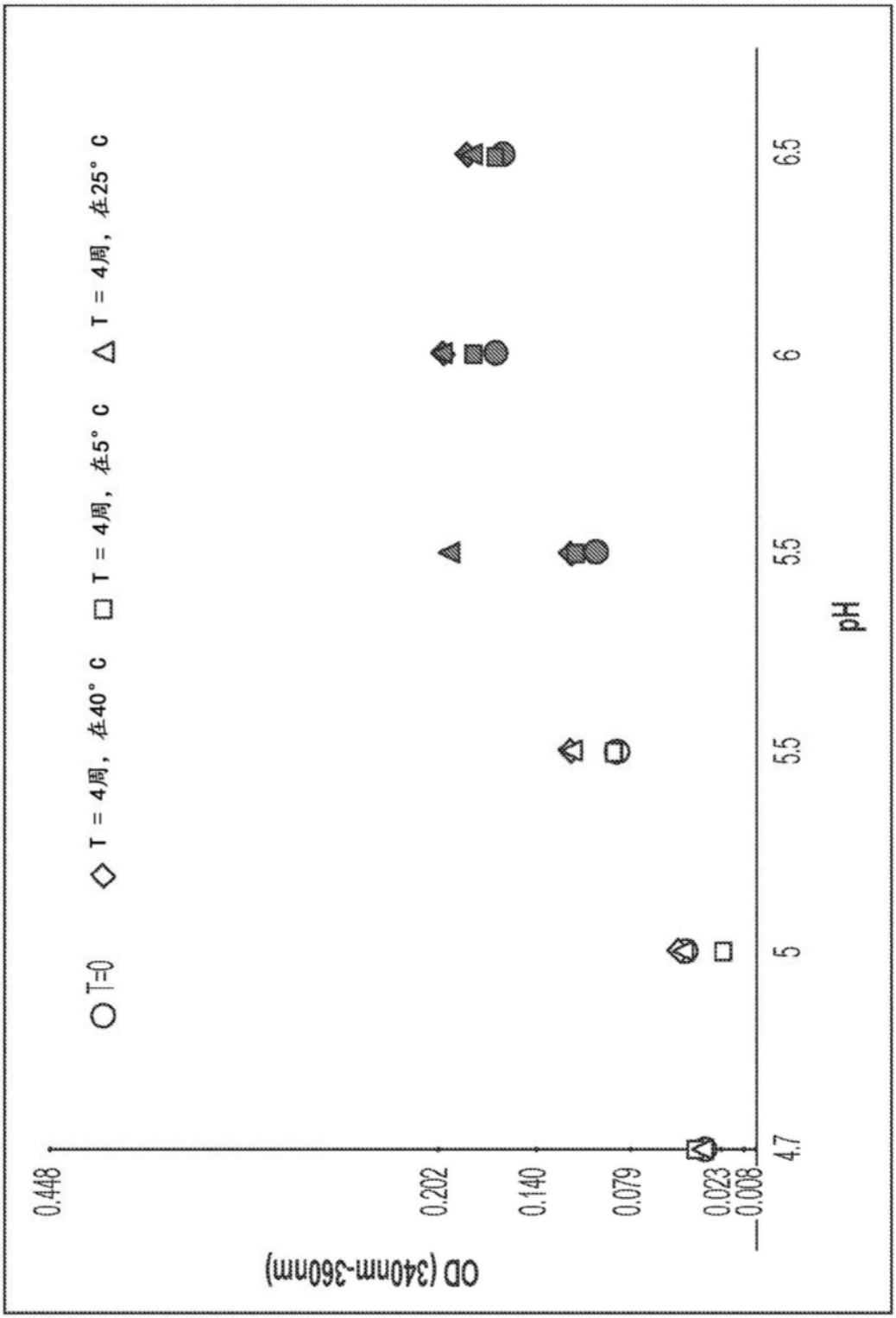

OD (340nm-360nm)
0.448
0.202
0.140
0.079
0.023
0.008
4.7
5
5.5
5.5
6
6.5
pH
○ T=0
◇ T = 4周，在40° C
□ T = 4周，在5° C
△ T = 4周，在25° C

图5

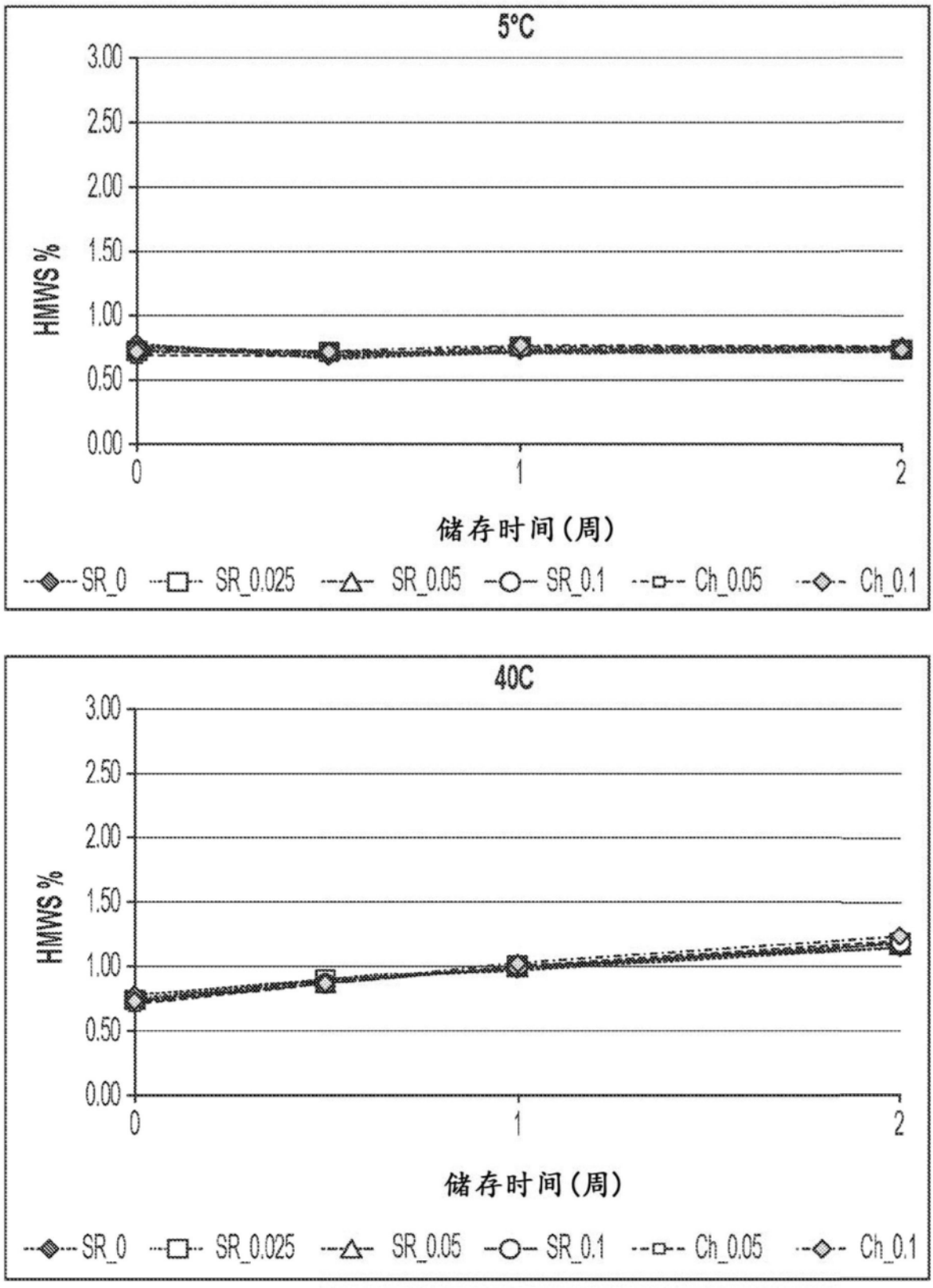
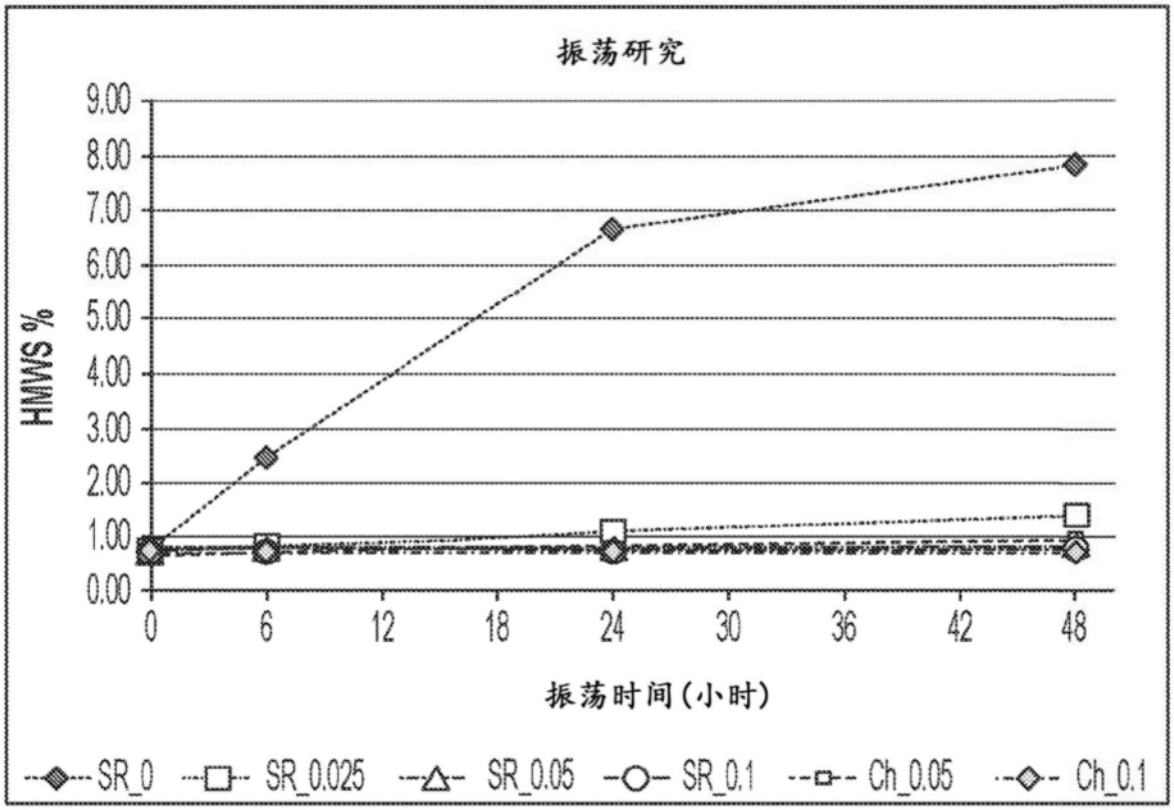

5°C
HMWS %
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0
1
2
储存时间(周)
SR_0
SR_0.025
SR_0.05
SR_0.1
Ch_0.05
Ch_0.1
40C
HMWS %
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0
1
2
储存时间(周)
SR_0
SR_0.025
SR_0.05
SR_0.1
Ch_0.05
Ch_0.1

图6


振荡研究
HMWS %
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0
6
12
18
24
30
36
42
48
振荡时间(小时)
SR_0
SR_0.025
SR_0.05
SR_0.1
Ch_0.05
Ch_0.1

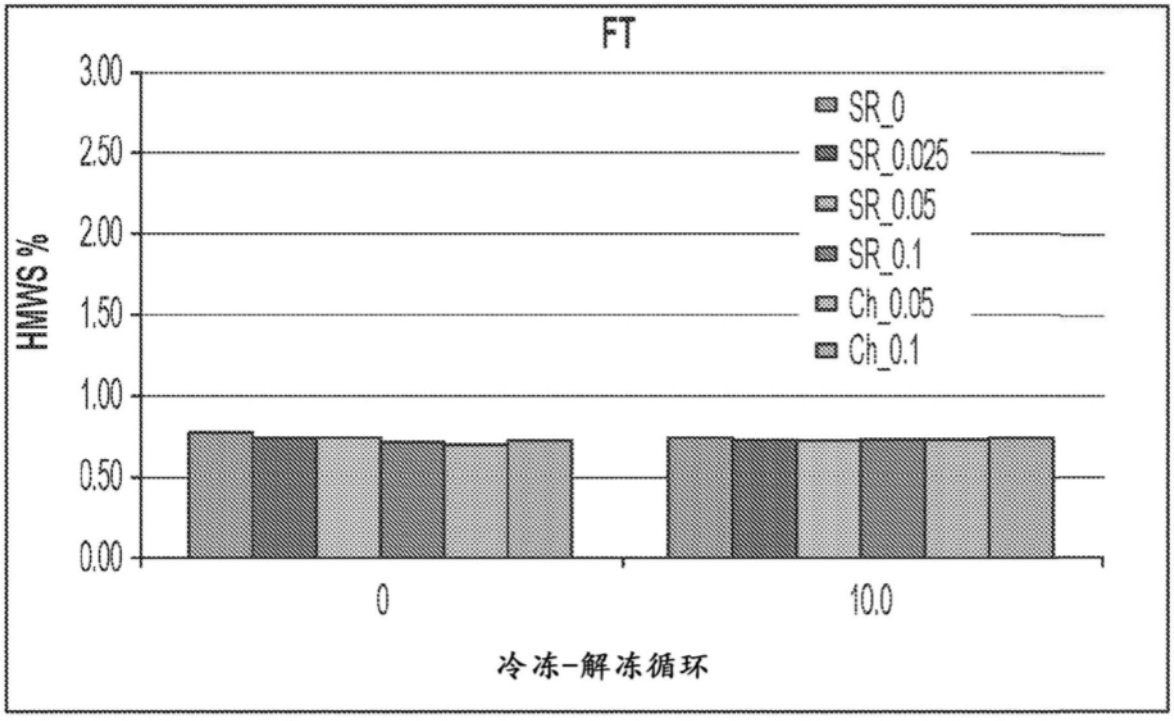

FT
HMWS %
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
SR_0
SR_0.025
SR_0.05
SR_0.1
Ch_0.05
Ch_0.1
0
10.0
冷冻-解冻循环

图6续

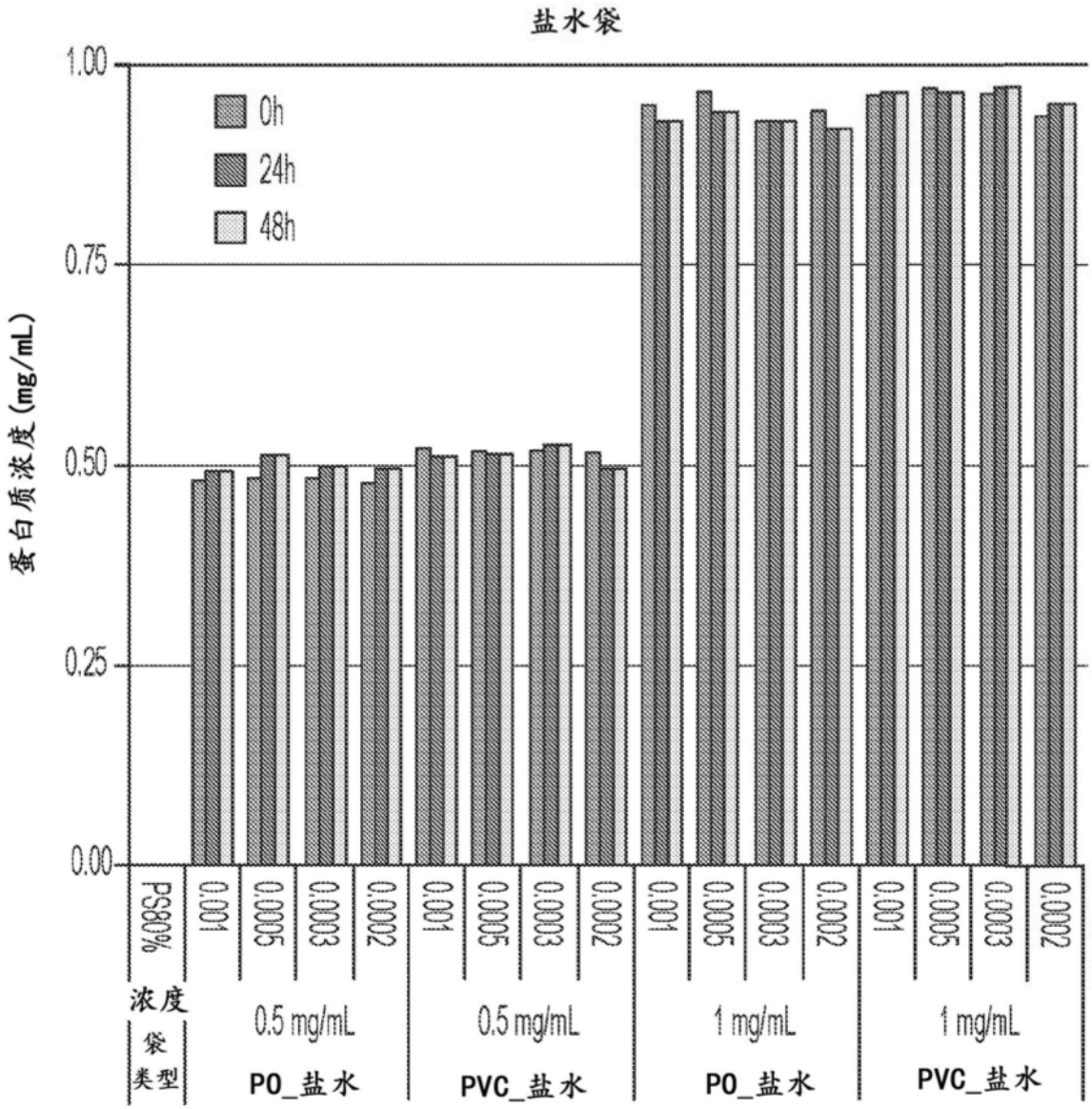

盐水袋
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
蛋白质浓度(mg/mL)
0h
24h
48h
PS80%
0.001
0.0005
0.0003
0.0002
浓度
袋类型
0.5 mg/mL
PO_盐水
0.5 mg/mL
PVC_盐水
1 mg/mL
PO_盐水
1 mg/mL
PVC_盐水

图7A

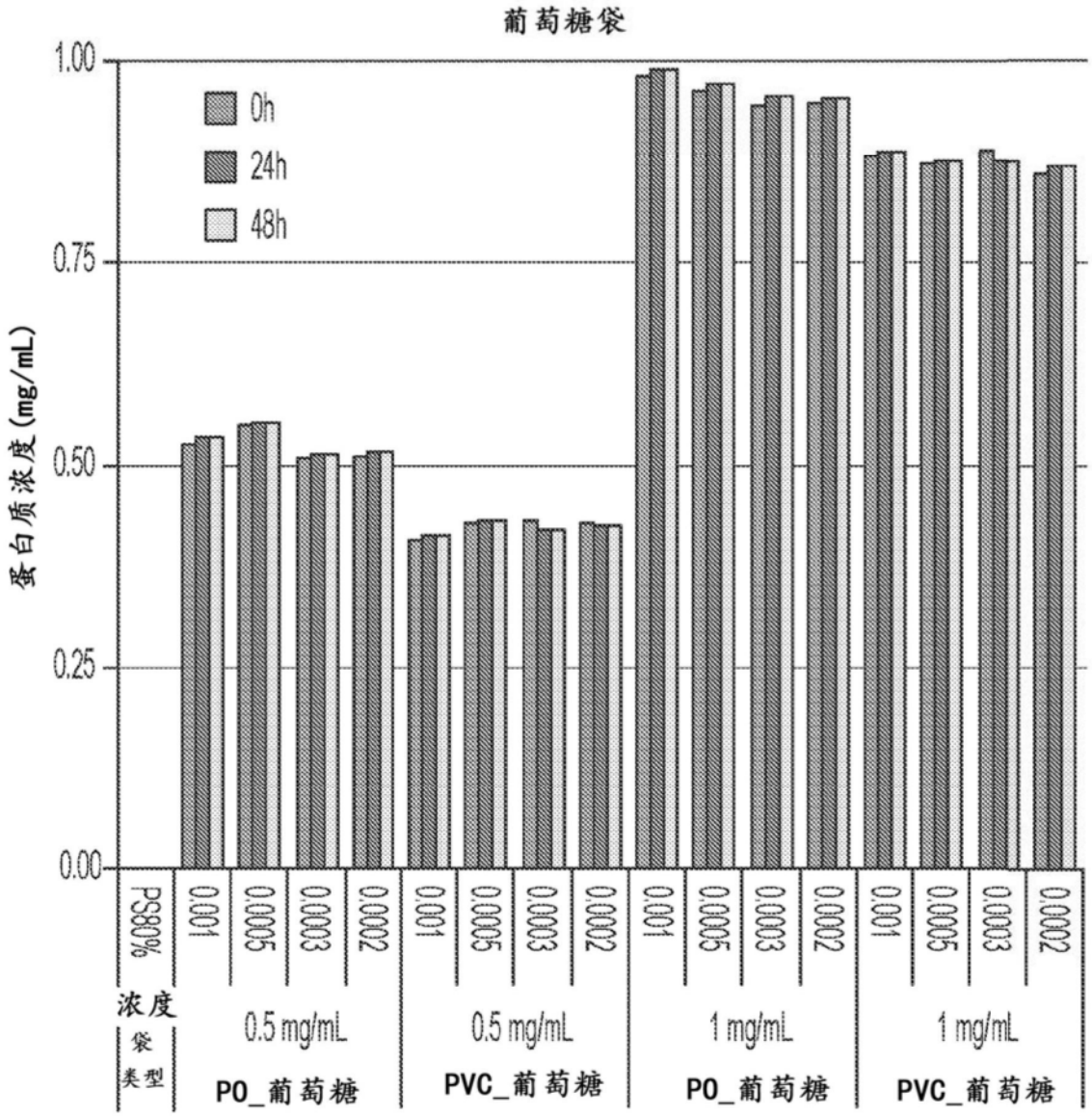

葡萄糖袋
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
蛋白质浓度(mg/mL)
0h
24h
48h
PS80%
0.001
0.0005
0.0003
0.0002
浓度
袋类型
0.5 mg/mL
PO_葡萄糖
PVC_葡萄糖
1 mg/mL

图7A续

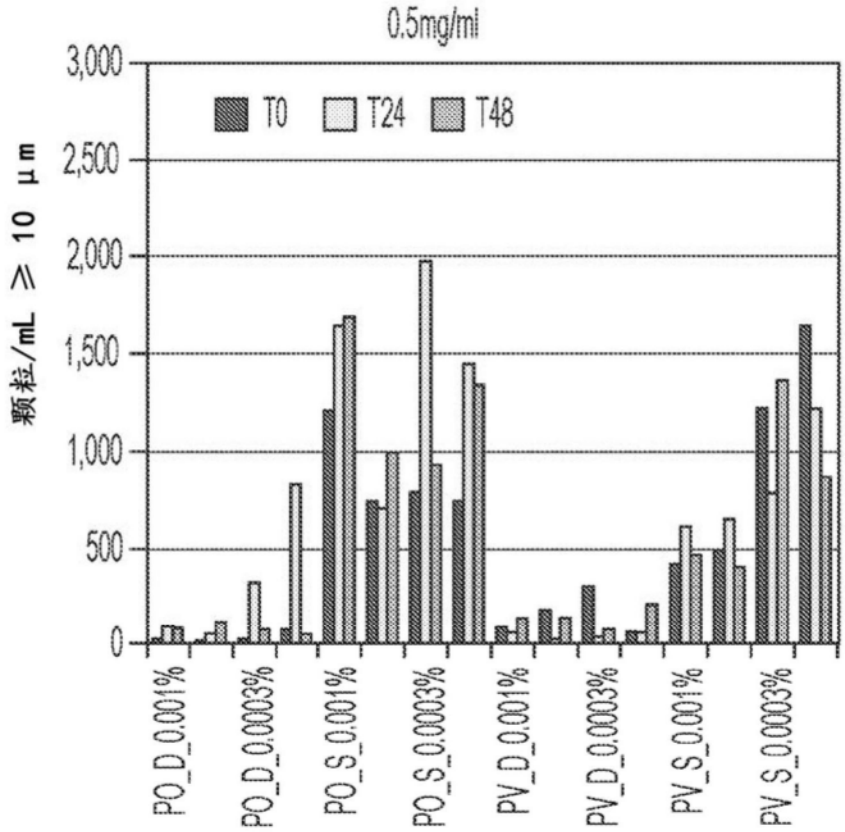

0.5mg/ml
T0
T24
T48
颗粒/mL ≥ 10 μm
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
PO_D_0.001%
PO_D_0.0003%
PO_S_0.001%
PO_S_0.0003%
PV_D_0.001%
PV_D_0.0003%
PV_S_0.001%
PV_S_0.0003%

图7B

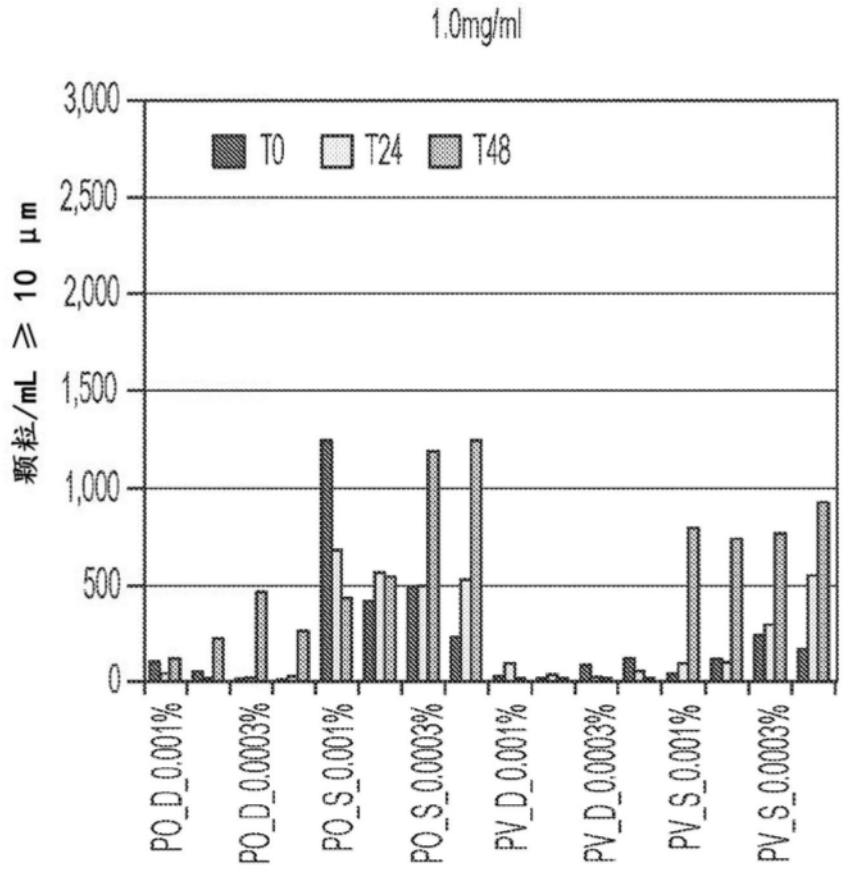

1.0mg/ml
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
T0
T24
T48
颗粒/mL ≥ 10 μm
PO_D_0.001%
PO_D_0.0003%
PO_S_0.001%
PO_S_0.0003%
PV_D_0.001%
PV_D_0.0003%
PV_S_0.001%
PV_S_0.0003%

图7B续

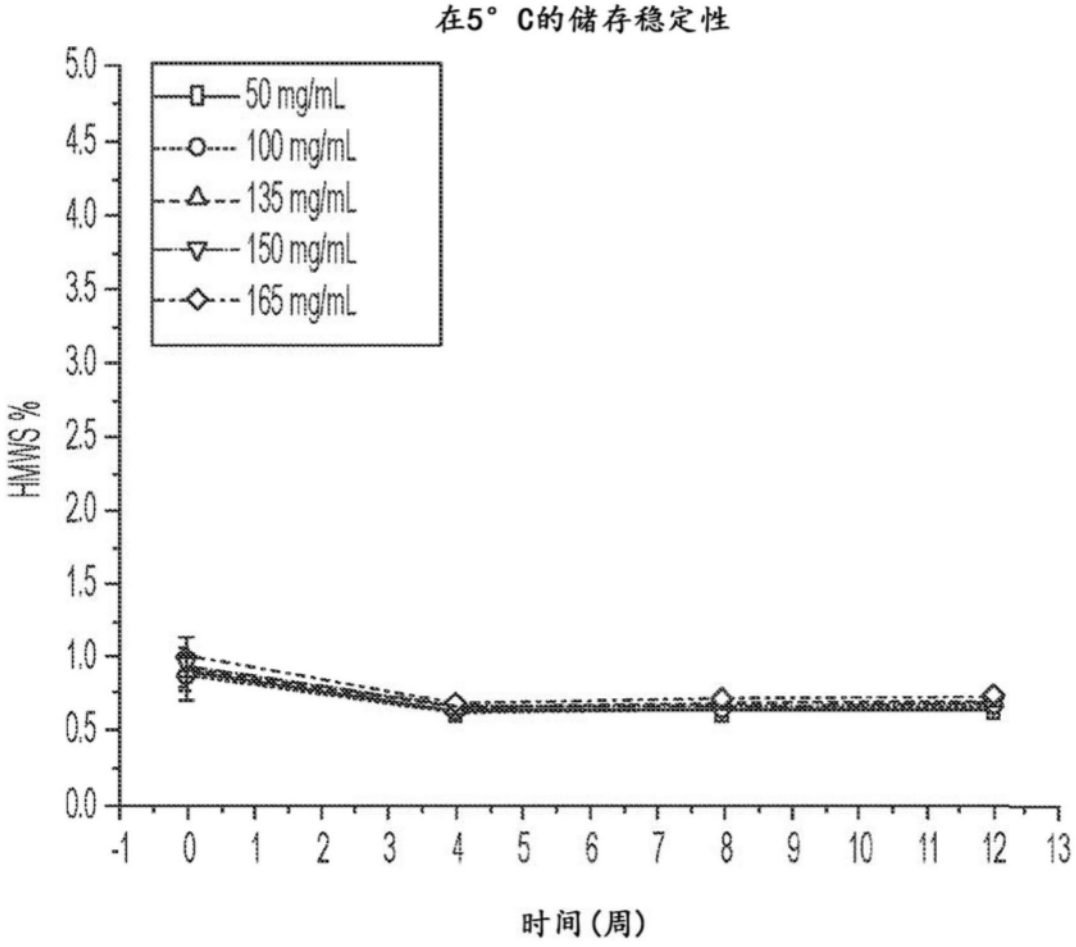

在5° C的储存稳定性
50 mg/mL
100 mg/mL
135 mg/mL
150 mg/mL
165 mg/mL
HMWS %
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
时间(周)

图8A

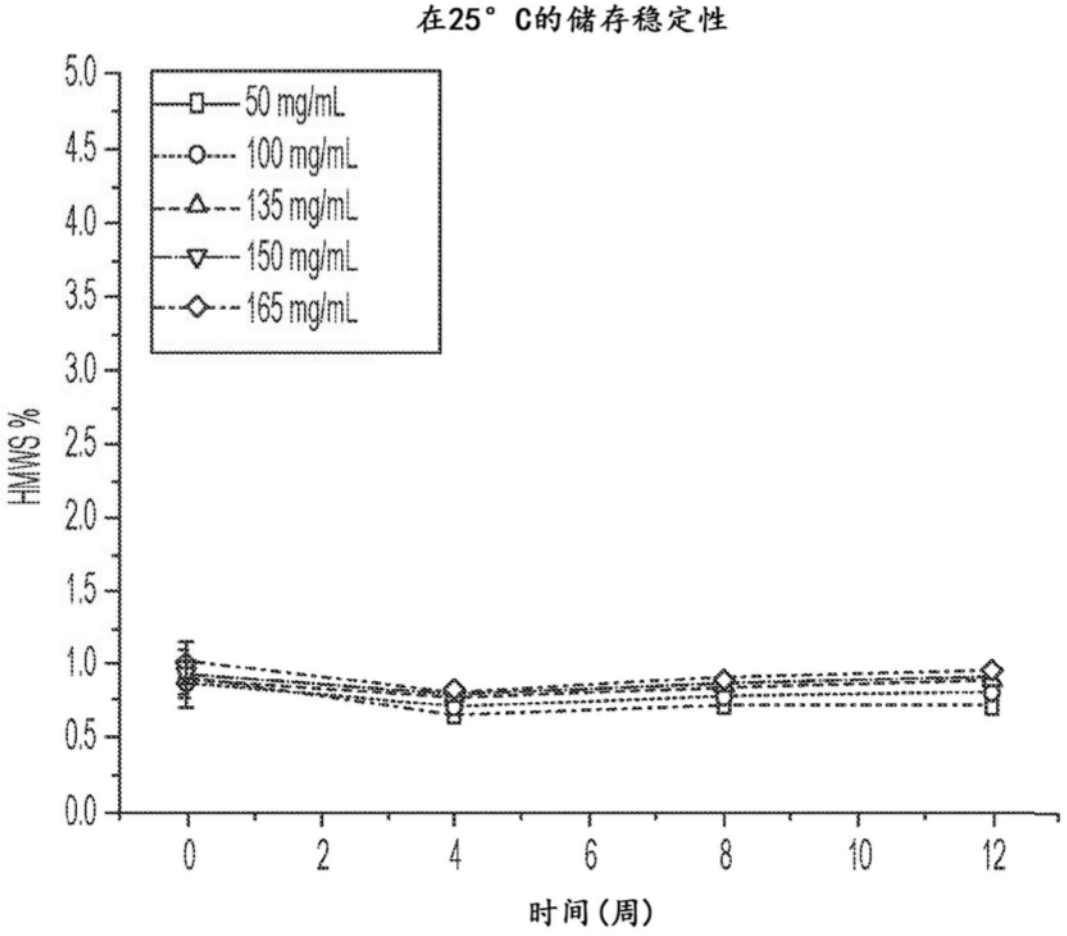

在25° C的储存稳定性
50 mg/mL
100 mg/mL
135 mg/mL
150 mg/mL
165 mg/mL
HMWS %
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
2
4
6
8
10
12
时间(周)

图8A续

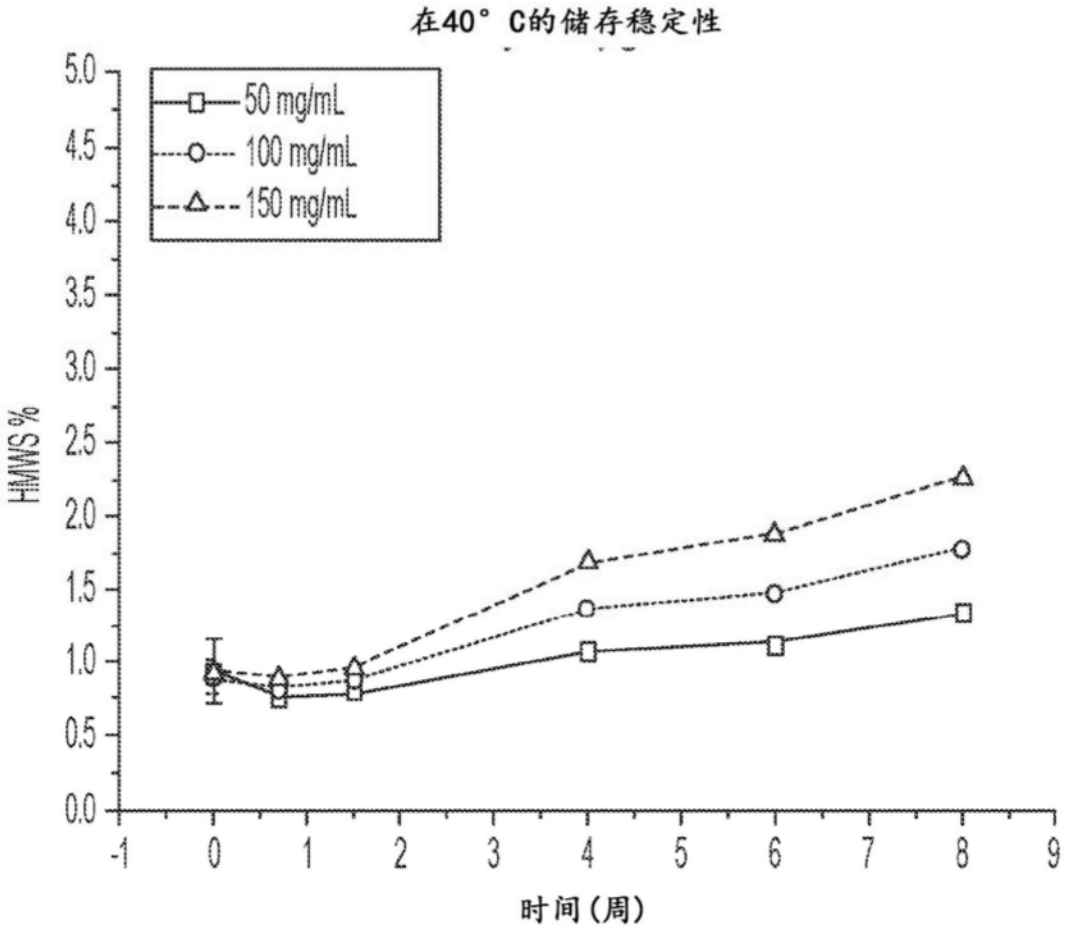

在40° C的储存稳定性
50 mg/mL
100 mg/mL
150 mg/mL
HMWS %
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
时间(周)

图8A续

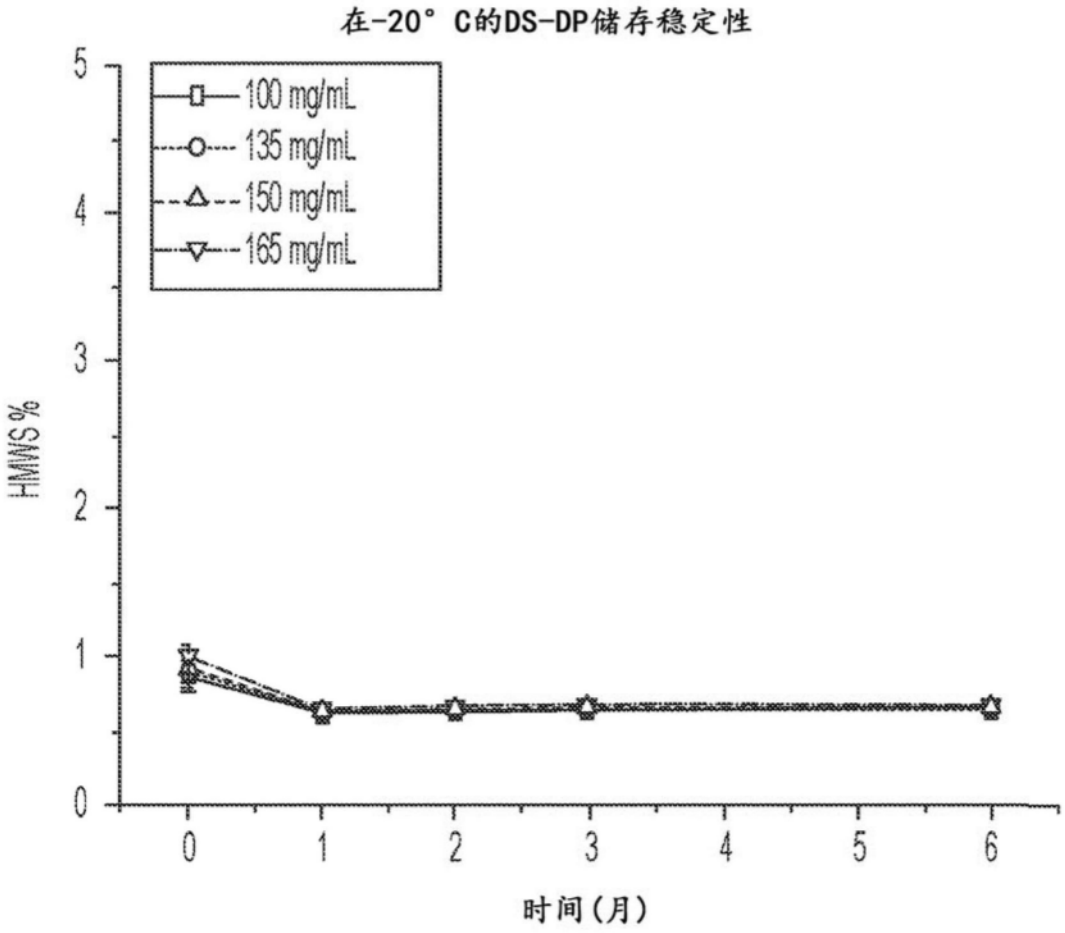

在-20° C的DS-DP储存稳定性
100 mg/mL
135 mg/mL
150 mg/mL
165 mg/mL
HMWS %
0
1
2
3
4
5
6
时间(月)

图8B

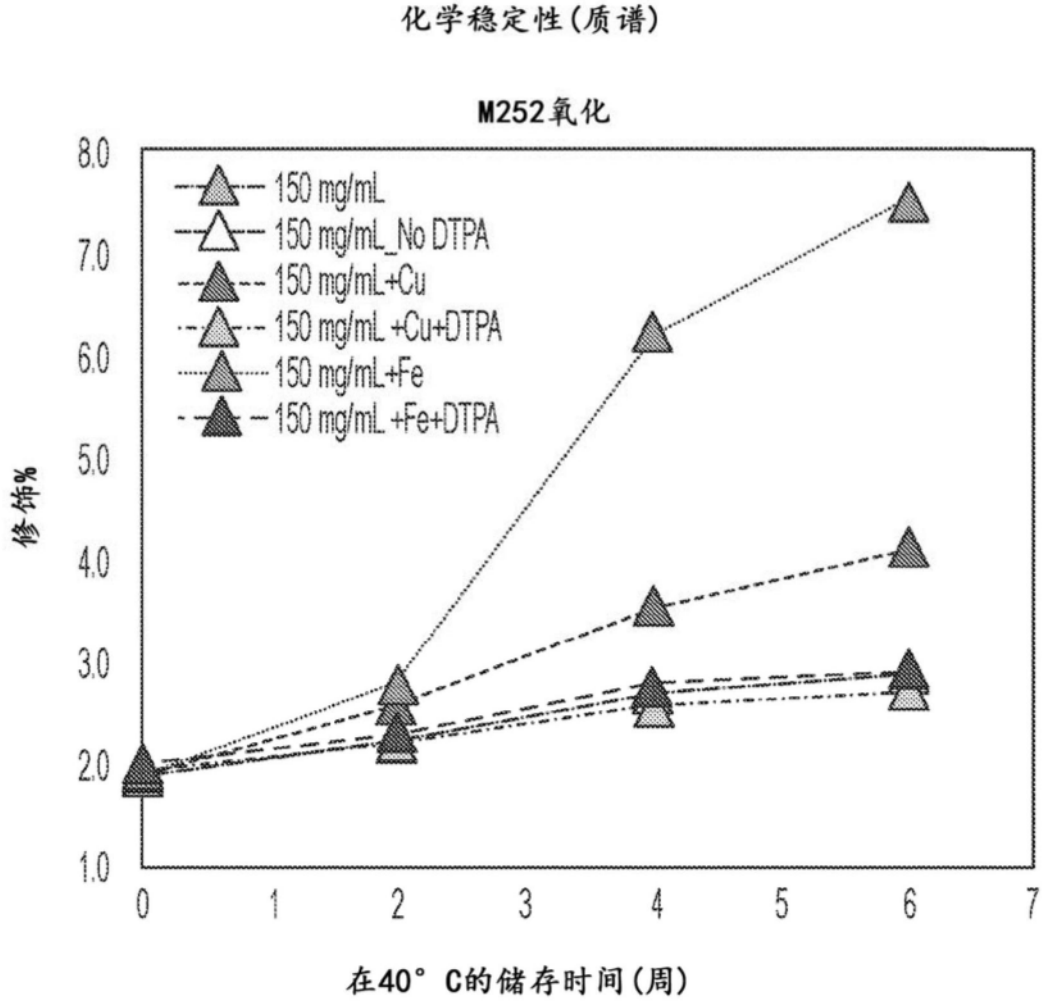

化学稳定性(质谱)
M252氧化
150 mg/mL
150 mg/mL_No DTPA
150 mg/mL+Cu
150 mg/mL +Cu+DTPA
150 mg/mL+Fe
150 mg/mL +Fe+DTPA
修饰%
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
1
2
3
4
5
6
7
在40° C的储存时间(周)

图9

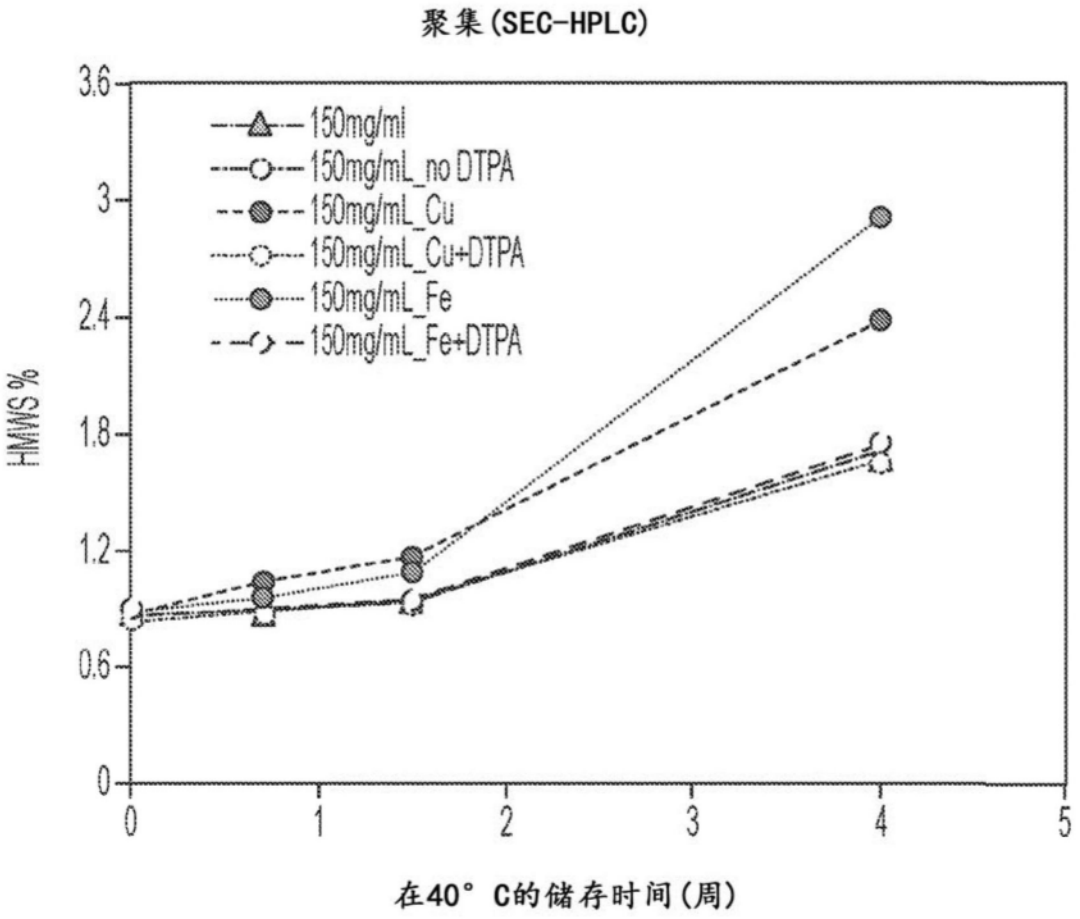

聚集(SEC-HPLC)
3.6
3
2.4
1.8
1.2
0.6
0
HMWS %
150mg/ml
150mg/mL_no DTPA
150mg/mL_Cu
150mg/mL_Cu+DTPA
150mg/mL_Fe
150mg/mL_Fe+DTPA
0
1
2
3
4
5
在40° C的储存时间(周)

图9续

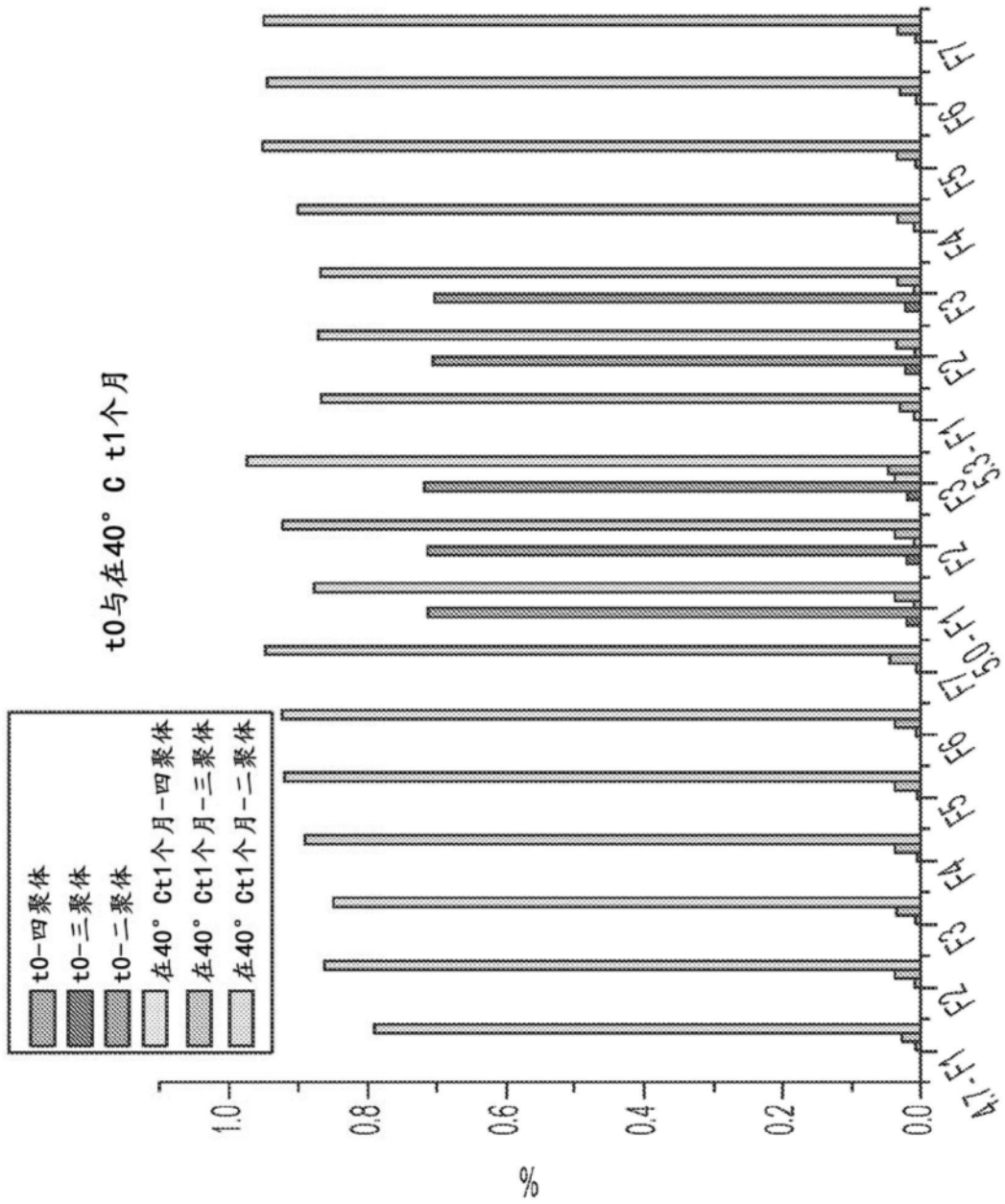

t0与在40° C t1个月
t0-四聚体
t0-三聚体
t0-二聚体
在40° Ct1个月-四聚体
在40° Ct1个月-三聚体
在40° Ct1个月-二聚体
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
%
F1-4
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F1-0.5
F2
F3-3.5
F1-3.5
F2
F3
F4
F5
F6
F7

图10

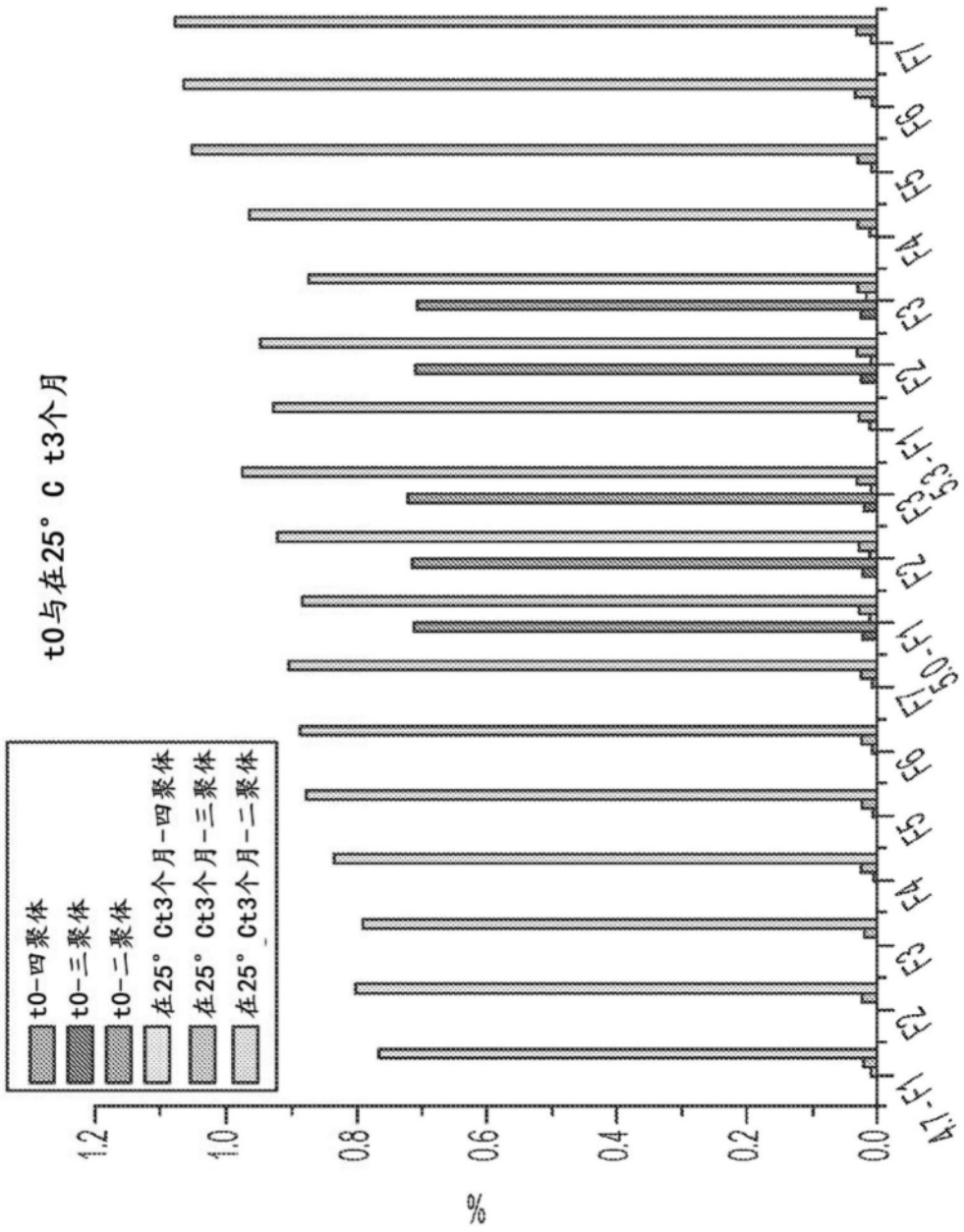

t0与在25° C t3个月
t0-四聚体
t0-三聚体
t0-二聚体
在25° Ct3个月-四聚体
在25° Ct3个月-三聚体
在25° Ct3个月-二聚体
%
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
4.7-F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
5.0-F1
F2
F3
5.3-F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7

图10续