



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112543645 A

(43) 申请公布日 2021.03.23

(21) 申请号 201980040536.7

(22) 申请日 2019.04.17

(30) 优先权数据

62/658772 2018.04.17 US

62/776686 2018.12.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/027790 2019.04.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/204380 EN 2019.10.24

(71) 申请人 前瞻疗法公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 C·尤南 W·登达姆龙维特

M·希利-弗里德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 甘霖 黄希贵

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

权利要求书3页 说明书47页

序列表5页 附图22页

(54) 发明名称

用于治疗疾病的贝伐珠单抗的缓冲制剂

(57) 摘要

本发明提供了贝伐珠单抗的缓冲水性制剂。本发明进一步提供了制备贝伐珠单抗的缓冲制剂的方法。本发明提供了通过施用本公开内容的缓冲抗体组合物来治疗眼病、特别是湿性年龄相关性黄斑变性和黄斑水肿的方法。

1. 一种缓冲抗体制剂,其包含含有重链和轻链的抗体,所述重链包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列,所述缓冲抗体制剂用于在治疗受试者中的眼病况中使用。

2. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述眼病症是视网膜、巩膜、玻璃体、晶状体、瞳孔、虹膜、角膜、脉络膜、视神经、视网膜脉管系统、睫状体或眼角的病症。

3. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述眼病症是视网膜或脉络膜的病症。

4. 根据权利要求3使用的制剂,其中视网膜或脉络膜的眼病症是年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、近视性变性、特发性脉络膜新生血管形成、炎症性脉络膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、息肉样脉络膜血管病变、眼新生血管形成、视网膜分支静脉闭塞(BRVO)、视网膜中央静脉闭塞、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、视网膜炎、色素性视网膜炎、斯塔加特病、乌谢尔综合征、视网膜变性、眼内炎、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、特发性近中心凹毛细血管扩张、格子样变性、黄斑裂孔、持久性胎儿脉管系统、视网膜动脉阻断或视网膜母细胞瘤。

5. 根据权利要求3使用的制剂,其中视网膜或脉络膜的眼病症是年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性或新生血管年龄相关性黄斑变性。

6. 根据权利要求3使用的制剂,其中视网膜或脉络膜的眼病症是湿性年龄相关性黄斑变性。

7. 根据权利要求3使用的制剂,其中视网膜或脉络膜的眼病症是黄斑水肿。

8. 根据权利要求1使用的制剂,其中口服地、静脉内地、玻璃体内地、肌肉内地、局部地、皮下地、脉络膜上地、经由滴眼剂或经由通过粘膜组织的直接吸收将缓冲抗体制剂施用给受试者。

9. 根据权利要求8使用的制剂,其中通过玻璃体内注射将缓冲抗体制剂施用给受试者。

10. 根据权利要求1使用的制剂,其中每个月1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、28、29、30或31次将缓冲抗体制剂施用给受试者。

11. 根据权利要求1使用的制剂,其中每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周将缓冲抗体制剂施用给受试者。

12. 根据权利要求1使用的制剂,其中将缓冲抗体制剂施用给受试者持续4、8、16、24、36或52周的时间段。

13. 根据权利要求1使用的制剂,其中将缓冲抗体制剂施用给受试者持续1、2、3、4、5或10年的时间段。

14. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述缓冲抗体制剂具有10-50天的半衰期。

15. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约10 mg/ml至约50 mg/ml的抗体。

16. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约15 mg/ml至约35 mg/ml的抗体。

17. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约23 mg/ml至约27 mg/ml的抗体。

18. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约24 mg/ml至约27 mg/ml的抗体。

19. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约25 mg/ml至约26 mg/ml的抗体。

20. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约25.5 mg/ml的抗体。

21. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约25 mg/ml的抗体。

22. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约30 mM至约70 mM的柠檬酸盐磷酸

盐。

23. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约40 mM至约60 mM的柠檬酸盐磷酸盐。

24. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约48 mM至约52 mM的柠檬酸盐磷酸盐。

25. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约49 mM至约51 mM的柠檬酸盐磷酸盐。

26. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约50 mM至约51 mM的柠檬酸盐磷酸盐。

27. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约30 mM至约70 mM的磷酸钠。

28. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约40 mM至约60 mM的磷酸钠。

29. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约48 mM至约52 mM的磷酸钠。

30. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约49 mM至约51 mM的磷酸钠。

31. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约50 mM至约51 mM的磷酸钠。

32. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含磷酸二氢钠、磷酸氢二钠或者磷酸二氢钠和磷酸氢二钠。

33. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述缓冲液包含约50 mM的磷酸钠。

34. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述缓冲液包含约51 mM的磷酸钠。

35. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约120 mM至约180 mM的海藻糖。

36. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约140 mM至约180 mM的海藻糖。

37. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约150 mM至约170 mM的海藻糖。

38. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约157 mM至约161 mM的海藻糖。

39. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约158 mM至约160 mM的海藻糖。

40. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约159 mM的海藻糖。

41. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约160 mM的海藻糖。

42. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约0.02% (v/v) 至约0.06% (v/v) 的聚山梨酯20。

43. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约0.03% (v/v) 至约0.05% (v/v) 的聚山梨酯20。

44. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约0.04% (v/v) 的聚山梨酯20。

45. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂具有约5.6的pH。

46. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂具有约5.8的pH。

47. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂具有约6的pH。

48. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂具有约6.1的pH。

49. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述缓冲液包含约11 mM至约19 mM的乙酸钠。

50. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述缓冲液包含约13 mM至约17 mM的乙酸钠。

51. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述缓冲液包含约13 mM至约16 mM的乙酸钠。

52. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述缓冲液包含约15 mM的乙酸钠。

53. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约165 mM至约185 mM的蔗糖。

54. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约170 mM至约180 mM的蔗糖。

55. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约174 mM至约176 mM的蔗糖。

56. 根据权利要求1使用的制剂,其中所述制剂包含约175 mM的蔗糖。

57. 一种试剂盒,其包含:

a) 缓冲抗体制剂,其包含含有重链和轻链的抗体,所述重链包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列;和

b) 关于在用于治疗眼病症的方法中施用所述抗体制剂的说明书。

58. 根据权利要求57所述的试剂盒,其中所述眼病症是视网膜、巩膜、玻璃体、晶状体、瞳孔、虹膜、角膜、脉络膜、视神经、视网膜脉管系统、睫状体或眼角的病症。

59. 根据权利要求57所述的试剂盒,其中所述眼病症是视网膜或脉络膜的病症。

60. 根据权利要求57所述的试剂盒,其中视网膜或脉络膜的眼病症是年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、近视性变性、特发性脉络膜新生血管形成、炎症性脉络膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、息肉样脉络膜血管病变、眼新生血管形成、视网膜分支静脉闭塞(BRVO)、视网膜中央静脉闭塞、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、视网膜炎、色素性视网膜炎、斯塔加特病、乌谢尔综合征、视网膜变性、眼内炎、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、特发性近中心凹毛细血管扩张、格子样变性、黄斑裂孔、持久性胎儿脉管系统、视网膜动脉阻断或视网膜母细胞瘤。

61. 根据权利要求57所述的试剂盒,其中视网膜或脉络膜的眼病症是年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性或新生血管年龄相关性黄斑变性。

62. 根据权利要求57所述的试剂盒,其中视网膜或脉络膜的眼病症是湿性年龄相关性黄斑变性。

63. 根据权利要求57所述的试剂盒,其中所述说明书包括关于施用如在权利要求1-56中的任一项中所述的稳定抗体的说明书。

64. 根据权利要求57所述的试剂盒,所述试剂盒进一步包含用于注射所述缓冲抗体制剂的装置,其选自包含以下成员的集合:注射器、针头和导管。

## 用于治疗疾病的贝伐珠单抗的缓冲制剂

### [0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求2018年12月7日提交的美国临时申请号62/776,686和2018年4月17日提交的美国临时申请号62/658,772的优先权,它们中的每一篇的内容以它们的整体和为了所有目的通过引用并入本文。

### [0002] 序列表的并入

命名为“ONBI-013\_001W0\_SeqListing\_ST25.txt”的文本文件(其创建于2019年4月16日且是9 KB大小)的内容特此通过引用整体并入。

## 发明领域

[0003] 本发明总体上涉及抗体制剂化学的领域。更具体地,本发明涉及针对血管内皮生长因子(VEGF)的抗体的缓冲制剂,该制剂增强了抗体的热稳定性和胶体稳定性,从而增强了抗体的长期储存。这样的稳定抗体制剂可用于治疗眼病症(包括其中VEGF失调的那些)的方法中。

### [0004] 发明背景

作为“生物产品价格竞争和创新法案”(Biologics Price Competition and Innovation Act, BPCIA)的一部分,如果数据表明除其它因素外,生物药物产品(在活生物体中生产或从活生物体衍生出)“高度类似于”已经批准的生物产品,则该产品可以被证明是“生物类似的”。生物类似产品应至少保留美国食品药品监督管理局批准的生物产品的生物学功能和治疗功效。但是,生物类似产品的配制可以不同于批准的生物产品。该制剂可以改善生物药物产品的稳定性和贮存性能,并且还可以改善治疗特定疾病或病况的功效。该制剂还可以改善施用的其它方面,包括减少患者不适或患者在施用批准的生物产品后可能经历的其它不良影响。

[0005] 抗体分子可以用作生物药物,并且许多这样的抗体被批准用于人类。抗体分子可以生产为生物类似物,并相应地重新配制。本领域中仍然需要高质量抗体生物类似物。

[0006] 已知在商标阿伐他汀®(Avastin®)(Genentech, Inc., San Francisco, CA)下销售的贝伐珠单抗抗体在储存条件下以两种形式聚集:非共价的可逆聚集体和共价的非可逆聚集体。据信,后者(共价聚集体)出现在抗原结合结构域中,并因此减少可用于结合血管内皮生长因子(VEGF)的结合位点的数量。结果,抗体的效能降低。通常需要减少这样的聚集体,特别是对于抗体诸如贝伐珠单抗。本公开内容解决了本领域中的这些需求。

## 发明内容

[0007] 在某些实施方案中,公开内容的特征在于在有此需要的受试者中治疗眼病症的方法,所述方法包括给所述受试者施用缓冲抗体制剂,其包含含有重链和轻链的抗体,所述重链包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列。

[0008] 在本公开内容的某些实施方案中,所述眼病症是视网膜、巩膜、玻璃体、晶状体、瞳孔、虹膜、角膜、脉络膜、视神经、视网膜脉管系统、睫状体或眼角的病症。在本公开内容的某

些实施方案中,所述眼病症是视网膜或脉络膜的病症。在本公开内容的某些实施方案中,视网膜或脉络膜的眼病症是年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、近视性变性、特发性脉络膜新生血管形成、炎症性脉络膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、息肉样脉络膜血管病变、眼新生血管形成、视网膜分支静脉闭塞(BRVO)、视网膜中央静脉闭塞、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、视网膜炎、色素性视网膜炎、斯塔加特病、乌谢尔综合征、视网膜变性、眼内炎、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、特发性近中心凹(juxtafoveal)毛细血管扩张、格子样变性、黄斑裂孔、持久性胎儿脉管系统、视网膜动脉阻断或视网膜母细胞瘤。

[0009] 在本公开内容的某些实施方案中,视网膜或脉络膜的眼病症是年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性或新生血管年龄相关性黄斑变性。在本公开内容的某些实施方案中,视网膜或脉络膜的眼病症是湿性年龄相关性黄斑变性。在本公开内容的某些实施方案中,视网膜或脉络膜的眼病症是黄斑水肿。

[0010] 在本公开内容的某些实施方案中,口服地、静脉内地、玻璃体内地、肌肉内地、局部地、皮下地、脉络膜上地、经由滴眼剂或经由通过粘膜组织的直接吸收将缓冲抗体制剂施用给受试者。在本公开内容的某些实施方案中,通过玻璃体内注射将缓冲抗体制剂施用给受试者。

[0011] 在本公开内容的某些实施方案中,每月1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、28、29、30或31次将缓冲抗体制剂施用给受试者。在本公开内容的某些实施方案中,每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周将缓冲抗体制剂施用给受试者。在本公开内容的某些实施方案中,将缓冲抗体制剂施用给受试者持续4、8、16、24、36或52周的时间段。在本公开内容的某些实施方案中,将缓冲抗体制剂施用给受试者持续1、2、3、4、5或10年的时间段。在本公开内容的某些实施方案中,所述缓冲抗体制剂具有10-50天的半衰期。

[0012] 在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约10 mg/ml至约50 mg/ml的抗体。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约15 mg/ml至约35 mg/ml的抗体。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约23 mg/ml至约27 mg/ml的抗体。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约24 mg/ml至约27 mg/ml的抗体。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约25 mg/ml至约26 mg/ml的抗体。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约25.5 mg/ml的抗体。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约25 mg/ml的抗体。

[0013] 在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约30 mM至约70 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约40 mM至约60 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约48 mM至约52 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约49 mM至约51 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约50 mM至约51 mM的柠檬酸盐磷酸盐。

[0014] 在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约30 mM至约70 mM的磷酸钠。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约40 mM至约60 mM的磷酸钠。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约48 mM至约52 mM的磷酸钠。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约49 mM至约51 mM的磷酸钠。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约50 mM至约51 mM的磷酸钠。

[0015] 在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含磷酸二氢钠、磷酸氢二钠或者磷酸二氢钠和磷酸氢二钠。在本公开内容的某些实施方案中,所述缓冲液包含约50 mM的磷酸钠。在本公开内容的某些实施方案中,所述缓冲液包含约51 mM的磷酸钠。

[0016] 在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约120 mM至约180 mM的海藻糖。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约140 mM至约180 mM的海藻糖。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约150 mM至约170 mM的海藻糖。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约157 mM至约161 mM的海藻糖。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约158 mM至约160 mM的海藻糖。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约159 mM的海藻糖。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约160 mM的海藻糖。

[0017] 在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约0.02% (v/v) 至约0.06% (v/v) 的聚山梨酯20。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约0.03% (v/v) 至约0.05% (v/v) 的聚山梨酯20。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约0.04% (v/v) 的聚山梨酯20。

[0018] 在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂具有约5.6的pH。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂具有约5.8的pH。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂具有约6的pH。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂具有约6.1的pH。

[0019] 在本公开内容的某些实施方案中,所述缓冲液包含约11 mM至约19 mM的乙酸钠。在本公开内容的某些实施方案中,所述缓冲液包含约13 mM至约17 mM的乙酸钠。在本公开内容的某些实施方案中,所述缓冲液包含约13 mM至约16 mM的乙酸钠。在本公开内容的某些实施方案中,所述缓冲液包含约15 mM的乙酸钠。

[0020] 在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约165 mM至约185 mM的蔗糖。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约170 mM至约180 mM的蔗糖。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约174 mM至约176 mM的蔗糖。在本公开内容的某些实施方案中,所述制剂包含约175 mM的蔗糖。

[0021] 在某些实施方案中,公开内容的特征在于一种试剂盒,其包含:a) 缓冲抗体制剂,其包含含有重链和轻链的抗体,所述重链包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列;和b) 关于在用于治疗眼病症的方法中施用所述抗体制剂的说明书。在本公开内容的某些实施方案中,所述眼病症是视网膜、巩膜、玻璃体、晶状体、瞳孔、虹膜、角膜、脉络膜、视神经、视网膜脉管系统、睫状体或眼角的病症。在本公开内容的某些实施方案中,所述眼病症是视网膜或脉络膜的病症。在本公开内容的某些实施方案中,视网膜或脉络膜的眼病症是年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、近视性变性、特发性脉络膜新生血管形成、炎症性脉络膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、息肉样脉络膜血管病变、眼新生血管形成、视网膜分支静脉闭塞(BRVO)、视网膜中央静脉闭塞、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、视网膜炎、色素性视网膜炎、斯塔加特病、乌谢尔综合征、视网膜变性、眼内炎、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、特发性近中心凹毛细血管扩张、格子样变性、黄斑裂孔、持久性胎儿脉管系统、视网膜动脉阻断或视网膜母细胞瘤。在本公开内容的某些实施方案中,视网膜或脉络膜的眼病症是年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性或新生血管年龄相关性黄斑变性。在本公

开内容的某些实施方案中,视网膜或脉络膜的眼病症是湿性年龄相关性黄斑变性。

[0022] 在本公开内容的某些实施方案中,所述说明书包括关于施用如在权利要求1-56中的任一项中所述的稳定抗体的说明书。在本公开内容的某些实施方案中,所述试剂盒进一步包含用于注射所述缓冲抗体制剂的装置,所述装置选自包含以下成员的集合:注射器、针头和导管。

## 附图说明

[0023] 图1显示了DSC图,该图显示了各种稳定剂对50 mM磷酸钠缓冲液中贝伐珠单抗热稳定性的影响。图中显示了表1中的条件1、2、9和10。

[0024] 图2A显示了当在5°C储存18个月的持续时间时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配(Match))、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗聚集体的百分比。

[0025] 图2A (i):显示了当将产品在5°C储存18个月的持续时间时条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)和条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)的色谱覆盖(通过使用纯净注射条件的尺寸排阻色谱法(SEC)测量并定量总聚集体)。

[0026] 图2A (ii)显示了当将产品在5°C储存18个月的持续时间时条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)的色谱覆盖(通过使用纯净注射条件的尺寸排阻色谱法(SEC)测量并定量总聚集体)。

[0027] 图2B显示了当在5°C储存18个月的持续时间时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗共价二聚体的百分比。

[0028] 图2B (i)显示了当将产品在5°C储存18个月时条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)和条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)的色谱覆盖(通过使用稀释注射条件的尺寸排阻色谱法(SEC)测量并定量贝伐珠单抗共价二聚体)。

[0029] 图2B (ii)显示了当将产品在5°C储存18个月时条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)的色谱覆盖(通过使用稀释注射条件的尺寸排阻色谱法(SEC)测量并定量贝伐珠单抗共价二聚体)。

[0030] 图2B (iii)显示了当在5°C储存18个月时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中通过阳离子交换色谱法(CEX)测得的贝伐珠单抗酸性物质的百分比的变化。

[0031] 图2B (iv)显示了当将产品在5°C储存18个月时条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)和条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)的色谱覆盖(通过阳离子交换色谱法(CEX)测量并定量%酸性物质、%碱性物质

和%主要物质)。

[0032] 图2B (v) 显示了当将产品在5°C储存18个月时条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)的色谱覆盖(通过阳离子交换色谱法(CEX)测量并定量%酸性物质、%碱性物质和%主要物质)。

[0033] 图2C显示了当在30°C储存时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗聚集体的百分比。

[0034] 图2D显示了当在30°C储存时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗共价二聚体的百分比。

[0035] 图2E显示了当在37°C储存时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗聚集体的百分比。

[0036] 图2F显示了当在37°C储存时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗共价二聚体的百分比。

[0037] 图2G显示了当受到摇动应激时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗聚集体的百分比。

[0038] 图2H显示了当受到摇动应激时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗共价二聚体的百分比。

[0039] 图2I显示了当受到冷冻/融化应激时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗聚集体的百分比。

[0040] 图2J显示了当受到冷冻/融化应激时在条件1 (贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配)、条件2 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 5.8)、条件3 (贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐,pH 6.0)、条件4 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.6)和条件5 (贝伐珠单抗乙酸盐,pH 5.8)中的贝伐珠单抗共价二聚体的百分比。

[0041] 图3显示了具有变化浓度的贝伐珠单抗的流体动力学尺寸。

[0042] 图4显示了加速稳定性T=0固有荧光发射扫描色氨酸图。

[0043] 图5显示了制备稳定抗体组合物ONS-5010的过程的流程图。超滤和渗滤(UF/DF)过

程是制备稳定抗体组合物的倒数第二个步骤。

[0044] 图6A显示了在第一个实验中在UF/DF过程中中间物质的蛋白浓度和%HMWS。每对条形图左侧的条形图指示蛋白浓度。每对条形图右侧的条形图指示%HMWS。

[0045] 图6B显示了在第二轮中在UF/DF过程中中间物质的蛋白浓度和%HMWS。每对条形图左侧的条形图指示蛋白浓度。每对条形图右侧的条形图指示%HMWS。

[0046] 图6C显示了在第三轮中在UF/DF过程中中间物质的蛋白浓度和%HMWS。每对条形图左侧的条形图指示蛋白浓度。每对条形图右侧的条形图指示%HMWS。

[0047] 图7显示了通过尺寸排阻HPLC (SE-HPLC) 测量的,与稳定抗体组合物滴定至6.1的最终pH相关以及在最终的0.2 $\mu$ m过滤后的%HMWS的变化。

[0048] 图8显示了与在6% (w/v)  $\alpha$ ,  $\alpha'$  海藻糖水溶液中的渗滤、随后向5.8 g/L磷酸二氢钠一水合物、1.2 g/L磷酸氢二钠、无水、60.0 g/L $\alpha$ ,  $\alpha'$  海藻糖、0.04%聚山梨酯20的组合物中加入0.5 M磷酸钠溶液和10%聚山梨酯20溶液相关的%HMWS的变化。

[0049] 图9显示了原料药物质 (BDS) 的pH对%HMWS的影响。每组条形图左侧的条形图指示HEPES。每组条形图中间的条形图指示磷酸盐。每组条形图右侧的条形图指示氢氧化物。

[0050] 图10显示了改变ONS-5010渗余物的浓度对%HMWS的影响。中间组的条形图 (28 g/L) 的第四个条形图 (最右侧) 代表这样的等分试样:其中用固体磷酸二氢钠和磷酸氢二钠而不是储备溶液进行磷酸盐调节。

[0051] 图11显示了用于制备ONS-5010的UF/DF过程的流程图。

[0052] 图12显示了在五个进料流速下初始渗透通量相对于渗余物压强曲线的关系。图上的线从上至下代表500 LMH、400 LMH、300 LMH、200 LMH和100 LMH。

[0053] 图13显示了在起始缓冲液 (25mM乙酸钠、237mM氯化钠, pH 5.0) 中在五个进料流速下浓缩通量相对于渗余物压强曲线的关系。图上的线从上至下代表500 LMH、400 LMH、300 LMH、200 LMH和100 LMH。

[0054] 图14显示了在最终缓冲液中在五个进料流速下浓缩通量相对于渗余物压强曲线的关系。图上的线从上至下代表500 LMH、400 LMH、300 LMH、200 LMH和100 LMH。

[0055] 图15显示了稳定抗体组合物的浓度对渗滤优化的影响。图上的线从上至下代表最终缓冲液 (51 mM的磷酸钠、0.04%聚山梨酯, pH 6.1) 和起始缓冲液 (25mM乙酸钠、237mM氯化钠, pH 5.0)。

[0056] 图16示出了ONS-5010、美国许可的阿伐他汀和欧洲许可的阿伐他汀作为平均值的浓度-时间概况。在时间零点的垂直线表示给药。

## 具体实施方式

[0057] 本发明的特征在于用于储存贝伐珠单抗的缓冲制剂。贝伐珠单抗可以包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,或者含有SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链可变区。在缓冲制剂中,贝伐珠单抗可以以约10 mg至约50 mg、或更优选约15 mg/ml至约35 mg/ml、或更优选约24 mg/ml至约27 mg/ml、或更优选约25 mg/ml或约25.5 mg/ml的浓度存在。所述制剂是水性的,且所述缓冲液可以包含柠檬酸盐磷酸盐或乙酸钠,且所述制剂还可以包含稳定剂(其包含糖诸如海藻糖或蔗糖)、以及温和表面活性剂诸如聚山梨酯20。所述制

剂优选地具有约5.6至约6.1的酸性pH,且在某些方面,所述pH是约5.6,或约5.8,或约6。

[0058] 在某些方面,所述制剂包含含有约10 mM至约100 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约100 mM至约200 mM的海藻糖和约0.01% (v/v) 至约0.1% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,且具有约5.7至约6.1的pH。所述柠檬酸盐磷酸盐可以是在约30 mM至约70 mM、约40 mM至约60 mM、约48 mM至约52 mM、约49 mM至约51 mM、或约50 mM至约51 mM的浓度范围,或者可以是在约50 mM或约51 mM的浓度。所述海藻糖可以是在约120 mM至约180 mM、约150 mM至约170 mM、约157 mM至约161 mM、约140 mM至约180 mM、或约158 mM至约160 mM的浓度范围,或者在约159 mM或约160 mM的浓度。所述聚山梨酯可以是在约0.02% (v/v) 至约0.06% (v/v)、或约0.03% (v/v) 至约0.05% (v/v) 的浓度范围,或者可以是在约0.04% (v/v) 的浓度。制剂pH可以是约5.8或可以是约6。

[0059] 在某些方面,所述制剂包含含有约5 mM至约25 mM的乙酸钠三水合物、约150 mM至约201 mM的蔗糖、和约0.03% (v/v) 至约0.05% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,且具有约5.5至约5.9的pH。所述乙酸钠三水合物可以是在约11 mM至约19 mM、约13 mM至约17 mM、或约13 mM至约16 mM的浓度范围,或者可以是在约15 mM的浓度。所述蔗糖可以是在约165 mM至约185 mM、约170 mM至约180 mM、或约174 mM至约176 mM的浓度范围,或者可以是在约175 mM的浓度。

[0060] 本公开内容提供了一种缓冲抗体制剂,其包含:包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体,包含约10 mM至约100 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约100 mM至约200 mM的海藻糖和约0.01% (v/v) 至约0.1% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,其中所述抗体制剂具有约5.7至约6.1的pH。优选地,当在5°C在冷藏条件下储存时,所述抗体制剂稳定至少18个月。

[0061] 本公开内容也提供了一种缓冲抗体制剂,其包含:约15 mg/ml至约35 mg/ml的包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体,包含约40 mM至约60 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约140 mM至约180 mM的海藻糖和约0.02% (v/v) 至约0.06% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,其中所述抗体制剂具有约5.7至约6.1的pH。优选地,当在5°C在冷藏条件下储存时,所述抗体制剂稳定至少18个月。

[0062] 本公开内容提供了一种缓冲抗体制剂,其包含:约24 mg/ml至约27 mg/ml的包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体,包含约48 mM至约52 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约157 mM至约161 mM的海藻糖和约0.03% (v/v) 至约0.05% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,其中所述抗体制剂具有约5.8至约6.0的pH。优选地,当在5°C在冷藏条件下储存时,所述抗体制剂稳定至少18个月。

[0063] 本公开内容提供了一种缓冲抗体制剂,其包含:包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体,包含约50 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约159 mM的海藻糖和约0.04% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,其中所述抗体制剂具有约5.8或约6的pH。优选地,当在5°C在冷藏条件下储存时,所述抗体制剂稳定至少18个月。

[0064] 本公开内容也提供了一种缓冲抗体制剂,其包含:约20 mg/ml至约30 mg/ml的包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体,包含约5 mM至约25 mM的乙酸钠、约150 mM至约201 mM的蔗糖和约0.03% (v/v) 至约0.05% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,其中所述抗体制剂具有约5.6至约5.8的pH。优选地,当

在5°C在冷藏条件下储存时,所述抗体制剂稳定至少18个月。

[0065] 本公开内容也提供了一种缓冲抗体制剂,其包含:约24 mg/ml至约26 mg/ml的包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体,包含约13 mM至约17 mM的乙酸钠、约170 mM至约180 mM的蔗糖和约0.03% (v/v) 至约0.05% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,其中所述抗体制剂具有约5.6至约5.8的pH。优选地,当在5°C在冷藏条件下储存时,所述抗体制剂稳定至少18个月。

[0066] 本公开内容也提供了一种缓冲抗体制剂,其包含:包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体,包含约15 mM的乙酸钠、约175 mM的蔗糖和约0.04% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,其中所述抗体制剂具有约5.6或约5.8的pH。优选地,当在5°C在冷藏条件下储存时,所述抗体制剂稳定至少18个月。

[0067] 本公开内容也提供了一种缓冲抗体制剂,其包含:包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体,包含约15 mM的乙酸钠、约175 mM的蔗糖和约0.04% (v/v) 的聚山梨酯20的缓冲液,其中所述抗体制剂具有约5.6或约5.8的pH。优选地,当在5°C在冷藏条件下储存时,所述抗体制剂稳定至少18个月。

[0068] 本公开内容也提供了一种包含任何缓冲抗体制剂的试剂盒,所述制剂包含本文中公开的抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链。所述试剂盒可以进一步包含用于将抗体制剂注射进受试者的装置。所述装置可以包含注射器、针头、导管或它们的任意组合。所述试剂盒可以进一步包含用于治疗本文中公开的一种或多种癌症的说明书。

[0069] 本公开内容也提供了在有此需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括以有效地治疗所述癌症的量给所述受试者施用任何缓冲抗体制剂,其包含本文中公开的包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体。

[0070] 本公开内容也提供了用于制备治疗癌症的药物的任何缓冲抗体制剂,其包含本文中公开的包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体。

[0071] 任何抗体制剂均可用在用于治疗铂抗性的复发性上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌中的一种或多种的方法中。一般而言,所述方法包括以有效地治疗铂抗性的复发性上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌中的一种或多种的量给有此需要的受试者施用包括贝伐珠单抗抗体的制剂。所述受试者优选是人类,并且所述制剂优选通过静脉内输注或注射进行施用。任何抗体制剂均可类似地用于制备药物,所述药物用于治疗癌症诸如铂抗性的复发性上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌、持续性、复发性或转移性宫颈癌、转移性结直肠癌、转移性HER2 (人表皮生长因子受体2) 阴性的乳腺癌、转移性肾细胞癌,胶质母细胞瘤或非小细胞肺癌中的一种或多种。

[0072] 除非另外定义,在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。本文引用的所有专利和出版物通过引用整体并入并用于所有目的。

[0073] 在某些实施方案中,公开内容的特征在于生产稳定抗体组合物的方法。在某些实施方案中,所述方法包括超滤起始组合物,例如,具有约4.7至约5.3的pH的起始组合物。在某些实施方案中,所述起始组合物包含抗体和起始缓冲液组合物,基本上由其组成或由其

组成。在某些实施方案中,所述起始组合物包含约4 mg/ml至6 mg/ml之间的抗体(诸如包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链的抗体),基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,所述起始组合物的超滤产生浓缩组合物。在某些实施方案中,所述浓缩组合物包含约30 g/L至40 g/L之间(包括端点)的抗体。在某些实施方案中,所述浓缩组合物的pH是在约4.0至6.0之间,诸如在约4.5至5.5之间。在某些实施方案中,所述浓缩组合物的pH是5.0或是约5.0。

[0074] 在某些实施方案中,所述方法包括用包含6%海藻糖(w/v)水溶液的交换溶液交换(例如,渗滤)起始缓冲液组合物以产生海藻糖组合物。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物包含约20 g/L至50 g/L之间、约30至40 g/L之间、或约35 g/L的抗体,包括端点。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物包含约30 g/L至约40 g/L的抗体,包括端点。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物的pH是在约4.0至6.0之间,诸如在约4.5至5.5之间。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物的pH是5.0或是约5.0。

[0075] 在某些实施方案中,所述方法包括使所述海藻糖组合物与磷酸盐组合物接触以产生调过pH的组合物。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含约400至600 mM之间的磷酸钠,诸如在约450至550 mM之间的磷酸钠。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含约500 mM的磷酸钠。在某些实施方案中,调过pH的组合物中的磷酸钠的终浓度是在约40至60 mM之间,诸如在约45至55 mM之间。在某些实施方案中,调过pH的组合物中的磷酸钠的终浓度是约50 mM。在某些实施方案中,调过pH的组合物中的pH是在约5.0至7.0之间,诸如在约5.9至6.3之间,包括端点。在某些实施方案中,调过pH的组合物中的pH是约6.1。

[0076] 在某些实施方案中,所述方法包括配制用于递送给受试者的调过pH的组合物,由此生产稳定抗体组合物。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 15\%$ 高分子量物质(HMWS),诸如 $\leq 10\%$ 、 $\leq 7.5\%$ 、 $\leq 6\%$ 、 $\leq 5\%$ 、 $\leq 4\%$ 、 $\leq 3\%$ 、 $\leq 2.5\%$ 、 $\leq 2\%$ 、 $\leq 1.5\%$ 或 $\leq 1\%$ HMWS。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 6\%$ HMWS。

[0077] 在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物可以被称作ONS-5010。

[0078] 在某些实施方案中,所述起始组合物具有在约4.0至6.0之间的pH,诸如在约4.5至5.5之间,或在约4.7至5.3之间。在某些实施方案中,所述起始组合物具有约5.0的pH。

[0079] 在某些实施方案中,所述起始缓冲液组合物包含约10至40 mM之间的乙酸钠,诸如在约15至35 mM之间的乙酸钠,或在约20至30 mM之间的乙酸钠。在某些实施方案中,所述起始缓冲液组合物包含约25 mM的乙酸钠。在某些实施方案中,所述起始缓冲液包含在约200至300 mM之间的NaCl,诸如在约225至240 mM之间的NaCl。在某些实施方案中,所述起始缓冲液组合物包含约237 mM NaCl。在某些实施方案中,所述起始缓冲液组合物的pH是在约4.0至6.0之间,诸如在约4.5至5.5之间。在某些实施方案中,所述起始缓冲液组合物的pH是约5.0。

[0080] 在某些实施方案中,所述超滤包括使用30 kDA膜。在某些实施方案中,所述膜是聚醚砜膜。在某些实施方案中,所述膜承载 $\leq 1000 \text{ g/m}^2$ 、 $\leq 750 \text{ g/m}^2$ 、 $\leq 500 \text{ g/m}^2$ 或 $\leq 250 \text{ g/m}^2$ 的负载。在某些实施方案中,所述膜承载 $\leq$ 约500  $\text{g/m}^2$ 至 $\leq$ 约100  $\text{g/m}^2$ 的负载。在某些实施方案中,所述膜承载 $\leq$ 约300  $\text{g/m}^2$ 的负载。在某些实施方案中,所述超滤具有 $\leq$ 约450 LMH的进料流速。在某些实施方案中,所述超滤具有约375 LMH的进料流速。在某些实施方案中,所述超滤具有 $\leq$ 约25 psi的渗余物压强。在某些实施方案中,所述超滤具有5 psi或约5

psi的渗余物压强。在某些实施方案中,所述超滤具有 $\leq$ 约20 psi的跨膜压强(TMP)。在某些实施方案中,所述超滤具有约15 psi的跨膜压强(TMP)。

[0081] 在某些实施方案中,所述浓缩组合物包含约20至50 mg/ml之间的抗体,诸如在约25至45 mg/ml之间,或在约30至40 mg/ml之间。在某些实施方案中,所述浓缩组合物包含35 mg/ml的抗体。在某些实施方案中,所述浓缩组合物的pH是在约4.0至6.0之间,诸如在约4.5至5.5之间。在某些实施方案中,所述浓缩组合物的pH是5.0或是约5.0。

[0082] 本公开内容的特征在于生产稳定抗体组合物的方法,所述方法包括用交换溶液交换起始缓冲液组合物以产生海藻糖组合物,所述交换溶液包含6%海藻糖(w/v)水溶液,基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物包含约30 g/L至约40 g/L之间(包括端点)的抗体。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物的pH是在约4.0至6.0之间,诸如在约4.5至5.5之间。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物的pH是约5.0。

[0083] 在某些实施方案中,所述交换溶液包含6%(w/v) $\alpha$ ,  $\alpha'$ -海藻糖水溶液。在某些实施方案中,所述交换组合物的pH是在约4.0至6.0之间,诸如在约4.5至5.5之间。在某些实施方案中,所述交换组合物的pH是约5.0。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物包含约20至50 g/L之间的抗体,诸如在约25至45 g/L之间,或在约30至40 g/L之间。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物包含约35 g/L的抗体。

[0084] 本公开内容的方法可以包括浓缩和除极化海藻糖组合物。在某些实施方案中,所述除极化包括在 $\leq$ 30 psig的压强再循环海藻糖组合物。在某些实施方案中,所述再循环进行 $\leq$ 60分钟。在某些实施方案中,所述再循环进行约10分钟。在某些实施方案中,所述浓缩包括使用活塞流追赶(chase)。在某些这样的其中浓缩包括使用活塞流追赶(chase)的实施方案中,海藻糖组合物包含27.5 g/L至32.5 g/L之间(包括端点)的抗体。

[0085] 本公开内容的方法包括使海藻糖组合物与磷酸盐组合物接触以产生调过pH的组合物。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含约500 mM的磷酸钠,基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中,所述调过pH的组合物中的磷酸钠的终浓度是约50 mM。在某些实施方案中,所述调过pH的组合物中的磷酸钠的终浓度是在约5.0至7.0之间,诸如在约5.9至6.3之间,包括端点。在某些实施方案中,调过pH的组合物中的pH是约6.1。

[0086] 在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含约450至550 mM之间的磷酸钠、约500至520 mM之间的磷酸钠、或约510 mM的磷酸钠。在某些实施方案中,调过pH的组合物中的磷酸钠的终浓度是在约45至55 mM之间,诸如约51 mM。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含磷酸二氢钠。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含磷酸氢二钠。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含磷酸二氢钠和磷酸氢二钠。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含无水磷酸氢二钠。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含磷酸二氢钠一水合物。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含磷酸二氢钠二水合物。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含海藻糖。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含 $\alpha$ ,  $\alpha'$ -海藻糖。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含约10至15 g/L之间的无水磷酸氢二钠,诸如约12 g/L无水磷酸氢二钠。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含约50至75 g/L之间的磷酸二氢钠一水合物,诸如约58 g/L磷酸二氢钠一水合物。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含约50至70 g/L之间或约55至65 g/L之间的 $\alpha$ ,  $\alpha'$ -海藻糖,诸如约60 g/L $\alpha$ ,  $\alpha'$ -海藻糖。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物具有在约5.0至7.0之间的pH,诸如在约5.5至6.0之

间。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物具有5.74的pH。

[0087] 在某些实施方案中,所述接触步骤具有1秒至3600秒之间的持续时间,诸如在约1000至3000秒之间,在约1500至2500秒之间(包括端点)或约1800秒。

[0088] 本公开内容的方法包括配制用于递送给受试者的调过pH的组合物以产生稳定抗体组合物。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 15\%$ 高分子量物质(HMWS),诸如 $\leq 10\%$ 、 $\leq 7.5\%$ 、 $\leq 6\%$ 、 $\leq 5\%$ 、 $\leq 4\%$ 、 $\leq 3\%$ 、 $\leq 2.5\%$ 、 $\leq 2\%$ 、 $\leq 1.5\%$ 或 $\leq 1\%$ HMWS。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 6\%$ 高分子量物质(HMWS),基本上由其组成或由其组成。

[0089] 在某些实施方案中,所述配制步骤包括使调过pH的组合物与聚山梨酯组合物接触。在某些实施方案中,所述聚山梨酯组合物包含约20%、约15%、约10%、约5%或约1% (m/v) 聚山梨酯20。在某些实施方案中,所述聚山梨酯组合物包含约10% (m/v) 聚山梨酯20。

[0090] 在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物具有在5.9至6.3之间的pH,包括端点。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物具有6.1的pH。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物具有在约15至35 mg/ml之间的抗体终浓度,诸如在约20至30 mg/ml之间,包括端点。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物具有在22.5 mg/ml至27.5 mg/ml之间的抗体终浓度,包括端点。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物具有以下终浓度:在约0.01%至0.1% (m/v) 之间的聚山梨酯20,诸如在约0.02%至0.06% (m/v) 之间的聚山梨酯20。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物具有0.04% (m/v) 聚山梨酯20的终浓度。

[0091] 在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物具有以下电导率:在约2至6 mS/cm之间,诸如在约3至5 mS/cm之间,包括端点。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物具有在约3.5至约4.5 mS/cm之间的电导率,包括端点。

[0092] 在某些实施方案中,在配制步骤后在稳定抗体组合物中的预期抗体收率是 $\geq 80\%$ 、 $\geq 85\%$ 或 $\geq 90\%$ 。在某些实施方案中,在配制步骤后在稳定抗体组合物中的预期抗体收率是 $\geq 95\%$ 。

[0093] 在某些实施方案中,在配制步骤结束后24个月,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 15\%$ 、 $\leq 12\%$ 、 $\leq 10\%$ 、 $\leq 8\%$ 、 $\leq 7\%$ 、 $\leq 6\%$ 或 $\leq 5\%$ HMWS。在某些实施方案中,在配制步骤结束后24个月,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 8\%$ HMWS。在某些实施方案中,在配制步骤结束后每个月,所述稳定抗体组合物积累了约0.1%至1%之间、0.2%至0.6%之间、或0.3%至0.4%之间(包括端点)的HMWS。在某些实施方案中,在配制步骤结束后每个月,所述稳定抗体组合物积累了0.25%至0.50%之间(包括端点)的HMWS。

[0094] 在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 5$ 、4、3、2.5、2、1.5、1或0.5%(包括端点)的SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的甲硫氨酸残基的氧化。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 2.5\%$ (包括端点)的SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的甲硫氨酸残基的氧化。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 5$ 、4、3、2.5、2、1.5、1或0.5%(包括端点)的SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的甲硫氨酸残基的氧化。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 2.5\%$ (包括端点)的SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的甲硫氨酸残基的氧化。在一个特定实施方案中,SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的甲硫氨酸残基的氧化包括在SEQ ID NO: 1的位置258处的甲硫氨酸的氧化。

[0095] 在某些实施方案中,在配制步骤结束后10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多天内,将所述稳定抗体组合物在 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存。在某些实施方案中,在配制步骤结束后60

天内,将所述稳定抗体组合物在 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存。在某些实施方案中,在稳定抗体组合物的制备日期后60天内,将所述稳定抗体组合物在 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存。

[0096] 所述稳定抗体组合物可以用于在有此需要的受试者中治疗癌症。在某些实施方案中,治疗包括以有效地治疗所述癌症的量给所述受试者施用稳定抗体组合物。在某些实施方案中,所述受试者是人类。所述癌症可以是铂抗性的复发性上皮卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、持续性宫颈癌、复发性宫颈癌、转移性宫颈癌、转移性结直肠癌、转移性HER2阴性的乳腺癌、转移性肾细胞癌、胶质母细胞瘤或非小细胞肺癌。

[0097] 除非另有定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。在本说明书中,单数形式也包括复数形式,除非上下文另外清楚地指明。尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本公开内容的实践或试验中,但是在下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献为了所有目的通过引用整体并入。本文引用的参考文献不被视为要求保护的公开内容的现有技术。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法和实施例仅仅是示例性的,且不意图是限制性的。

[0098] 本公开内容的其它特征和优点将从下述详细描述和权利要求中显而易见。

[0099] 贯穿本公开内容,以范围格式呈现了所要求保护的主题的各个方面。应当理解,范围格式的描述仅是为了方便和简洁,且不应解释为对所要求保护的的主题的范围的不灵活限制。因此,范围的描述应被认为已经明确地公开了全部可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,在提供了值的范围的情况下,应当理解,在该范围的上限与下限之间的每个居间值以及在该陈述范围内的任何其它所述值或插入值被包括在所要求保护的的主题内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包含在较小范围中,并且还被包括在所要求保护的的主题内,具有在所述范围中的任何具体地排除的限制。在所述范围包括一个或两个限值的情况下,在所要求保护的的主题中还包括排除那些被包括的限制中的一个或两个的范围。不管范围的宽度,这均适用。

[0100] 本文中使用的术语“约”表示在该技术领域中的技术人员容易知道的各个值的通常误差范围。提及“约”,本文中的值或参数包括(且描述)指向该值或参数本身的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0101] 在整个说明书和权利要求书中使用与本发明的方面有关的各种术语。除非另外指出,否则给这样的术语赋予其在本领域中的普通含义。应当以与本文提供的定义一致的方式解释其它特别定义的术语。

[0102] 本文中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非明确地另外说明。

[0103] 本文中使用的术语“包含”、“具有”和“包括”涵盖更限制性的术语“基本上由……组成”和“由……组成”。

[0104] 术语受试者和患者互换使用,并且包括任何动物。受试者包括哺乳动物,包括伴侣和农场哺乳动物,以及啮齿动物,包括小鼠,兔子和大鼠,以及其它啮齿动物。非人灵长类动物是优选的受试者。人类是高度优选的受试者。

[0105] 术语组合物和制剂互换使用。因此,本公开内容的制剂可以是本公开内容的组合物,并且本公开内容的组合物可以是本公开内容的制剂。

[0106] 根据本发明已经观察到,贝伐珠单抗生物类似抗体(其特异性地结合血管内皮生长因子)的制剂可以用柠檬酸盐磷酸盐与海藻糖或蔗糖一起缓冲,或者用乙酸盐(替代柠檬酸盐磷酸盐)与蔗糖一起缓冲,其中缓冲液增强抗体的热和胶体稳定性,甚至比目前被批准用于患者使用的贝伐珠单抗(在商业名称阿伐他汀®下销售)制剂更好。具体地,本发明的制剂表现出显著更低的抗体聚集。缓冲液增加抗体分子的储存期限。因此,本公开内容的特征在于贝伐珠单抗生物类似抗体的缓冲制剂,其包括以下水性载体:在酸性pH的包含含有柠檬酸盐磷酸盐、以及海藻糖或蔗糖的缓冲液的水性载体,或者替代性地,在酸性pH的包含含有乙酸盐、以及蔗糖的缓冲液的水性载体。

[0107] 所述抗体特异性地结合血管内皮生长因子(VEGF)上的表位,并且所述表位可以是线性的或构象的。在某些方面,所述抗体包含重链,所述重链含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列,或与其具有至少或约80%、85%、90%、95%或99%同一性的序列。在某些优选的方面,所述抗体包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链。在某些优选的方面,所述抗体包含含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链。优选地,所述抗体包含重链恒定结构域和/或轻链恒定结构域。在高度优选的方面,所述抗体包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链。在某些方面,所述抗体包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的重链可变区和SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链可变区。

<b>贝伐珠单抗重链IgG1 (SEQ ID NO: 1)</b>
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWRQA PGKGLEWVGW INTYTGPEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DWVGQGLTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVWV DVSHPDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLG PGK
<b>贝伐珠单抗轻链(SEQ ID NO: 2)</b>
DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
<b>贝伐珠单抗重链可变区(SEQ ID NO: 3)</b>
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWRQA PGKGLEWVGW INTYTGPEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DWVGQGLTIVT VSS
<b>贝伐珠单抗轻链可变区(SEQ ID NO: 4)</b>
DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR

[0108] 在某些实施方案中,所述抗体是包含可变区和恒定区的全长抗体,尽管在某些方面,所述抗体可以包含全长抗体的衍生物或片段或部分,其保留全长抗体分子的抗原结合特异性,并且也优选地保留其亲和力的大部分或全部。所述抗体可以包含可能影响抗体活性或稳定性的翻译后修饰(PTM)或部分。所述抗体可以被甲基化、乙酰化、糖基化、硫酸化、磷酸化、羧酸酯化和/或酰胺化,并且可以包含本领域众所周知的其它部分。

[0109] 所述制剂优选地包含治疗有效量的抗体。治疗有效量可以变化,取决于抗体施用后治疗的疾病或病况,和/或取决于向其施用抗体的受试者的特征,诸如年龄、性别、高度、重量、疾病或病况的进展状态或阶段、以前施用的数目和效力、给受试者施用的其它治疗剂、以及从业人员已知的或在确定适当剂量时以其它方式考虑的其它特征。优选地,治疗有

效量是有效地治疗癌症诸如非鳞状非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤、肾细胞癌、宫颈癌或上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌的量。

[0110] 所述制剂可以包含约10 mg/ml至约50 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约10 mg/ml至约40 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约10 mg/ml至约30 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约20 mg/ml至约50 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约20 mg/ml至约40 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约20 mg/ml至约30 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约15 mg/ml至约45 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约15 mg/ml至约30 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约21 mg/ml至约29 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约22 mg/ml至约28 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约23 mg/ml至约27 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约24 mg/ml至约25 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25 mg/ml至约30 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25 mg/ml至约26 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25 mg/ml至约27 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25 mg/ml至约28 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25 mg/ml至约29 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25 mg/ml至约30 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约24 mg/ml至约27 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约24 mg/ml至约28 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约24 mg/ml至约29 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约24 mg/ml至约30 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25.5 mg/ml至约26 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25.4 mg/ml至约25.9 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25.6 mg/ml至约25.9 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25.5 mg/ml至约25.8 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25.5 mg/ml至约25.7 mg/ml的抗体。这些范围包括限定所述范围的上限和下限量。在某些方面,所述制剂包含约25 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25.5 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25.6 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25.7 mg/ml的抗体。在某些方面,所述制剂包含约25.8 mg/ml的抗体。

[0111] 所述抗体(例如,在本文描述或举例说明的浓度)优选地用缓冲的水性载体配制,并且所述载体优选地包含水。所述缓冲抗体制剂优选地呈液体形式,且更优选地呈适合于静脉内施用的液体形式。因而,缓冲制剂中的水的量可以根据期望的输注体积变化。在某些优选的方面,所述缓冲液包含柠檬酸盐磷酸盐、海藻糖和温和表面活性剂诸如聚山梨酯20,并且将抗体制剂维持在约5.8至约6.0的酸性pH。在某些替代性优选方面,所述缓冲液包含乙酸盐、蔗糖和温和表面活性剂诸如聚山梨酯20,并且将抗体制剂维持在约5.6至约5.8的酸性pH。当储存在缓冲制剂中时,所述抗体在正常储存条件下是耐贮存的。

[0112] 柠檬酸盐磷酸盐包含磷酸氢二钠十二水合物和柠檬酸一水合物的水性组合,其在包含约0.2 M磷酸氢二钠和约0.1 M柠檬酸的预混溶液中。

[0113] 所述缓冲液可以包含约10 mM至约100 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约20 mM至约90 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约30 mM至约70 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约30 mM至约80 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约40 mM至约70 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约40 mM至约60 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,

所述缓冲液可以包含约45 mM至约55 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约46 mM至约54 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约47 mM至约53 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约48 mM至约52 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约49 mM至约51 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约40 mM至约50 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约50 mM至约75 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约30 mM至约55 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约40 mM至约55 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约42 mM至约52 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约46 mM至约52 mM的柠檬酸盐磷酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约43 mM至约53 mM的柠檬酸盐磷酸盐。这些范围包括限定所述范围的上限和下限量。在某些方面,所述缓冲液包含约50 mM的柠檬酸盐磷酸盐。

[0114] 所述柠檬酸盐磷酸盐缓冲液可以包含约100 mM至约200 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约110 mM至约190 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约120 mM至约180 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约130 mM至约170 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约140 mM至约170 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约150 mM至约170 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约155 mM至约165 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约150 mM至约160 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约153 mM至约164 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约152 mM至约167 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约154 mM至约164 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约155 mM至约163 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约156 mM至约162 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约157 mM至约161 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约158 mM至约160 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约158.5 mM至约158.9 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约158.6 mM至约158.8 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约158 mM至约161 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约159 mM至约161 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约157 mM至约160 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约157 mM至约159 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约150 mM至约159 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约159 mM至约160 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约159 mM至约165 mM的海藻糖。这些范围包括限定所述范围的上限和下限量。在某些方面,所述缓冲液包含约159 mM的海藻糖。在某些方面,所述缓冲液包含约158.7 mM的海藻糖。在某些方面,可以以这些浓度中的任一种使用蔗糖来替代海藻糖。因而,例如,所述柠檬酸盐磷酸盐缓冲液可以包含蔗糖作为稳定剂来替代海藻糖。

[0115] 所述乙酸盐-蔗糖缓冲液可以包含约1 mM至约30 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约5 mM至约25 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约10 mM至约20 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约11 mM至约19 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约12 mM至约18 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约13 mM至约15 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约10 mM至约15 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约12 mM至约16 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液

液可以包含约12 mM至约15 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约13 mM至约16 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约13 mM至约17 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约14 mM至约18 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约14 mM至约16 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约15 mM至约20 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约5 mM至约15 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约11 mM至约17 mM的乙酸盐。在某些方面,所述缓冲液可以包含约15 mM至约16 mM的乙酸盐。这些范围包括限定所述范围的上限和下限量。在某些方面,所述缓冲液包含约15 mM的乙酸盐。优选地,所述乙酸盐是乙酸钠三水合物。

[0116] 所述乙酸盐-蔗糖或柠檬酸盐磷酸盐-蔗糖缓冲液可以包含约100 mM至约250 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约125 mM至约225 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约150 mM至约200 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约155 mM至约195 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约160 mM至约190 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约165 mM至约185 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约166 mM至约184 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约167 mM至约183 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约168 mM至约182 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约169 mM至约181 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约170 mM至约180 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约171 mM至约179 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约172 mM至约178 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约174 mM至约177 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约174 mM至约176 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约175 mM至约175.5 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约175.2 mM至约175.4 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约175 mM至约185 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约165 mM至约175 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约170 mM至约190 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液可以包含约150 mM至约175 mM的蔗糖。这些范围包括限定所述范围的上限和下限量。在某些方面,所述缓冲液包含约175 mM的蔗糖。在某些方面,所述缓冲液包含约175.3 mM的蔗糖。

[0117] 所述抗体制剂(例如,含有柠檬酸盐磷酸盐-海藻糖或乙酸盐蔗糖缓冲液)优选地包含非离子型表面活性剂。更优选地,所述非离子型表面活性剂包含聚山梨酯20(可以包含英国约克郡Croda International Plc的Tween® 20商标聚山梨酯)。所述抗体制剂(包括抗体和水性缓冲液)优选地包含约0.01%至约0.1%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.02%至约0.09%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.03%至约0.08%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.01%至约0.07%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.02%至约0.06%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.03%至约0.05%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.04%至约0.06%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.02%至约0.05%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.02%至约0.04%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.03%至约0.06%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.01%至约0.05%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.03%至约0.04%(按体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.04%至约0.05%(按

体积计)的聚山梨酯20。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.035%至约0.045%(按体积计)的聚山梨酯20。这些范围包括限定所述范围的上限和下限量。在某些方面,所述抗体制剂包含约0.04%(按体积计)的聚山梨酯20。

[0118] 所述抗体制剂(例如,含有柠檬酸盐磷酸盐-海藻糖/蔗糖或乙酸盐蔗糖缓冲液)优选地缓冲至酸性pH。所述制剂优选地具有约5.3至约6.5的pH。在某些方面,所述制剂具有约5.4至约6.4的pH。在某些优选的方面,所述制剂具有约5.4至约5.9的pH。在某些优选的方面,所述制剂具有约5.5至约5.8的pH。在某些优选的方面,所述制剂具有约5.6至约5.8的pH。在某些优选的方面,所述制剂具有约5.6至约5.9的pH。在某些方面,所述制剂具有约5.5至约5.3的pH。在某些优选的方面,所述制剂具有约5.6至约6.2的pH。在某些方面,所述制剂具有约5.7至约6.1的pH。在某些方面,所述制剂具有约5.8至约6.0的pH。在某些优选的方面,所述制剂具有约5.4至约5.9的pH。在某些方面,所述制剂具有约5.6至约5.9的pH。在某些优选的方面,所述制剂具有约5.7至约5.9的pH。在某些优选的方面,所述制剂具有约5.9至约6.1的pH。在某些方面,所述制剂具有约6.0至约6.2的pH。在某些方面,所述制剂具有约5.7至约6.0的pH。在某些优选的方面,所述制剂具有约5.8至约6.1的pH。这些范围包括限定所述范围的上限和下限量。在某些方面,所述制剂具有约5.8的pH。在某些方面,所述制剂具有约5.9的pH。在某些方面,所述制剂具有约6.0的pH。

[0119] 在某些优选的方面,所述抗体制剂包含约20 mg/ml至约30 mg/ml的抗体和缓冲液,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约30 mM至约70 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约150 mM至约170 mM的海藻糖、和约0.01%至约0.07%(按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.6至约6.0的pH。在某些方面,所述抗体制剂基本上由约20 mg/ml至约30 mg/ml的抗体和缓冲液组成,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约30 mM至约70 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约150 mM至约170 mM的海藻糖、和约0.01%至约0.07%(按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.6至约6.0的pH。在某些方面,所述抗体制剂由约20 mg/ml至约30 mg/ml的抗体和缓冲液组成,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约30 mM至约70 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约150 mM至约170 mM的海藻糖、和约0.01%至约0.07%(按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.6至约6.0的pH。在任何这样的实施方案中,所述抗体可以以约21 mg/ml至约29 mg/ml、或约22 mg/ml至约28 mg/ml、或约23 mg/ml至约27 mg/ml、或约24 mg/ml至约26 mg/ml、或约24.5 mg/ml至约26.5 mg/ml、约25 mg/ml、约26 mg/ml、约25.5 mg/ml、约25.6 mg/ml、约25.7 mg/ml或约25.8 mg/ml存在于所述制剂中。

[0120] 在某些优选的方面,所述抗体制剂包含约20 mg/ml至约30 mg/ml的抗体和缓冲液,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约40 mM至约60 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约154 mM至约164 mM的海藻糖和约0.02%至约0.06%(按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.6至约6.0的pH、或约5.8的pH、或约6.0的pH。在某些方面,所述抗体制剂基本上由约20 mg/ml至约30 mg/ml的抗体和缓冲液组成,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约40 mM至

约60 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约154 mM至约164 mM的海藻糖和约0.02%至约0.06% (按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.6至约6.0的pH、或约5.8的pH、或约6.0的pH。在某些方面,所述抗体制剂由约20 mg/ml至约30 mg/ml的抗体和缓冲液组成,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约40 mM至约60 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约154 mM至约164 mM的海藻糖和约0.02%至约0.06% (按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.6至约6.0的pH、或约5.8的pH、或约6.0的pH。在任何这样的实施方案中,所述抗体可以以约21 mg/ml至约29 mg/ml、或约22 mg/ml至约28 mg/ml、或约23 mg/ml至约27 mg/ml、或约24 mg/ml至约26 mg/ml、或约24.5 mg/ml至约26.5 mg/ml、约25 mg/ml、约26 mg/ml、约25.5 mg/ml、约25.6 mg/ml、约25.7 mg/ml或约25.8 mg/ml存在于所述制剂中。

[0121] 在某些优选的方面,所述抗体制剂包含约25 mg/ml至约26.5 mg/ml的抗体和缓冲液,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约45 mM至约55 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约157 mM至约161 mM的海藻糖和约0.03%至约0.05% (按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.6至约6.0的pH、或约5.8的pH、或约6.0的pH。在某些方面,所述抗体制剂基本上由约25 mg/ml至约26.5 mg/ml的抗体和缓冲液组成,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约45 mM至约55 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约157 mM至约161 mM的海藻糖和约0.03%至约0.05% (按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.6至约6.0的pH、或约5.8的pH、或约6.0的pH。在某些方面,所述抗体制剂由约25 mg/ml至约26.5 mg/ml的抗体和缓冲液组成,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约45 mM至约55 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约157 mM至约161 mM的海藻糖和约0.03%至约0.05% (按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.6至约6.0的pH、或约5.8的pH、或约6.0的pH。在任何这样的实施方案中,所述抗体可以以约25 mg/ml至约26 mg/ml、或约25.5 mg/ml至约26 mg/ml、约25 mg/ml、约26 mg/ml、约25.5 mg/ml、约25.6 mg/ml、约25.7 mg/ml或约25.8 mg/ml存在于所述制剂中。

[0122] 在某些优选的方面,所述抗体制剂包含约25.5 mg/ml至约26.1 mg/ml的抗体和缓冲液,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约50 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约159 mM的海藻糖和约0.04% (按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.8或约6.0的pH。在某些方面,所述抗体制剂基本上由约25.5 mg/ml至约26.1 mg/ml的抗体和缓冲液组成,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约50 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约159 mM的海藻糖和约0.04% (按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.8或约6.0的pH。在某些方面,所述抗体制剂由约25.5 mg/ml至约26.1 mg/ml的抗体和缓冲液组成,所述抗体特异性地结合VEGF且包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链,所述缓冲液包含约50 mM的柠檬酸盐磷酸盐、约159 mM的海藻糖和约0.04% (按体积计)的聚山梨酯20且具有约5.8或约6.0的pH。在任何这样的实施方案中,所述抗体可以以约26 mg/ml、约25.5 mg/ml、约25.6 mg/ml、约25.7 mg/ml或约25.8 mg/ml存在于所述制剂中。

[0123] 所述制剂稳定化所述抗体以实现改善的贮存性能,特别是在几个月至几年的阶段中。当在制剂中储存时,所述抗体在储存阶段中维持热和胶体稳定性。例如,当在制剂中储存时,所述抗体是稳定的并且表现出最少聚集、絮凝、片段化和变性,并且所述抗体保留它的VEGF结合活性。

[0124] 优选的是,将所述抗体制剂在冷藏条件下储存,且优选地在约2°C至约6°C的温度,包括约2°C、约3°C、约4°C、约5°C、约6°C、约7°C、约8°C。可以将所述抗体制剂在这样的温度储存至少约3个月。在某些方面,可以将所述抗体制剂在这样的温度储存至少约6个月。在某些方面,可以将所述抗体制剂在这样的温度储存至少约9个月。在某些方面,可以将所述抗体制剂在这样的温度储存至少约12个月。在某些方面,可以将所述抗体制剂在这样的温度储存至少约15个月。在某些方面,可以将所述抗体制剂在这样的温度储存至少约18个月。在某些方面,可以将所述抗体制剂在这样的温度储存至少约21个月。在某些方面,可以将所述抗体制剂在这样的温度储存至少约24个月。在储存期间,所述抗体是稳定的并且表现出最少聚集、絮凝、片段化和变性,并且所述抗体保留它的VEGF结合活性,使得所述抗体制剂可以从储存取出,施用给患者,且仍然对施用所述制剂所针对的病况表现出治疗效果。

[0125] 所述制剂优选地包含约20 mg/ml至约30 mg/ml的抗体,且更优选约25 mg/ml或约25.5 mg/ml、或约26 mg/ml的抗体。在抗体蛋白的该量中包括活性天然形式的抗体单体的百分比,以及具有降低的或不具有VEGF结合活性的抗体聚集体的百分比。高度优选的是,所述制剂包括最大量的功能性抗体单体和最小量的具有降低的结合活性和/或治疗效果(相对于未改变的单体)的抗体聚集体以及在结构上改变的抗体形式。例如,当在约2°C至约6°C储存至少约6个月时,所述抗体制剂优选地含有至少约85重量%的抗体单体和小于约15重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。

[0126] 在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约6个月时,所述抗体制剂含有至少约90重量%的抗体单体和小于约10重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约6个月时,所述抗体制剂含有至少约93重量%的抗体单体和小于约7重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约6个月时,所述抗体制剂含有至少约95重量%的抗体单体和小于约5重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约6个月时,所述抗体制剂含有至少约96重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约6个月时,所述抗体制剂含有至少约97重量%的抗体单体和小于约3重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约6个月时,所述抗体制剂含有至少约98重量%的抗体单体和小于约2重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约6个月时,所述抗体制剂含有至少约99重量%的抗体单体和小于约1重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。根据本领域中合适的任何技术,包括本文描述或举例说明的那些,包括示差光散射(DLS)、示差扫描量热法(DSC)、尺寸排阻色谱法(SE-HPLC)、非还原和还原毛细管电泳SDS(NR CE-SDS和R CE-SDS)和微粒计数(PC)中的任一种或组合,可以确定抗体单体和/或抗体聚集体的量。

[0127] 在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约12个月时,所述抗体制剂含有至少约

90重量%的抗体单体和小于约10重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约12个月时,所述抗体制剂含有至少约93重量%的抗体单体和小于约7重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约12个月时,所述抗体制剂含有至少约95重量%的抗体单体和小于约5重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约12个月时,所述抗体制剂含有至少约96重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约12个月时,所述抗体制剂含有至少约97重量%的抗体单体和小于约3重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约12个月时,所述抗体制剂含有至少约98重量%的抗体单体和小于约2重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约12个月时,所述抗体制剂含有至少约99重量%的抗体单体和小于约1重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。根据本领域中合适的任何技术,包括本文描述或举例说明的那些,包括示差光散射(DLS)、示差扫描量热法(DSC)、尺寸排阻色谱法(SE-HPLC)、非还原和还原毛细管电泳SDS(NR CE-SDS和R CE-SDS)和微粒计数(PC)中的任一种或组合,可以确定抗体单体和/或抗体聚集体的量。

[0128] 在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约18个月时,所述抗体制剂含有至少约90重量%的抗体单体和小于约10重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约18个月时,所述抗体制剂含有至少约93重量%的抗体单体和小于约7重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约18个月时,所述抗体制剂含有至少约95重量%的抗体单体和小于约5重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约18个月时,所述抗体制剂含有至少约96重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约18个月时,所述抗体制剂含有至少约97重量%的抗体单体和小于约3重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约18个月时,所述抗体制剂含有至少约98重量%的抗体单体和小于约2重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约18个月时,所述抗体制剂含有至少约99重量%的抗体单体和小于约1重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。根据本领域中合适的任何技术,包括本文描述或举例说明的那些,包括示差光散射(DLS)、示差扫描量热法(DSC)、尺寸排阻色谱法(SE-HPLC)、非还原和还原毛细管电泳SDS(NR CE-SDS和R CE-SDS)和微粒计数(PC)中的任一种或组合,可以确定抗体单体和/或抗体聚集体的量。

[0129] 在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约24个月时,所述抗体制剂含有至少约90重量%的抗体单体和小于约10重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约24个月时,所述抗体制剂含有至少约93重量%的抗体单体和小于约7重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约24个月时,所述抗体制剂含有至少约95重量%的抗体单体和小于约5重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某

些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约24个月时,所述抗体制剂含有至少约96重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约24个月时,所述抗体制剂含有至少约97重量%的抗体单体和小于约3重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约24个月时,所述抗体制剂含有至少约98重量%的抗体单体和小于约2重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。在某些方面,当在约2°C至约8°C储存至少约24个月时,所述抗体制剂含有至少约99重量%的抗体单体和小于约1重量%的具有降低的VEGF结合活性和/或治疗效果的抗体聚集体。根据本领域中合适的任何技术,包括本文描述或举例说明的那些,包括示差光散射(DLS)、示差扫描量热法(DSC)、尺寸排阻色谱法(SE-HPLC)、非还原和还原毛细管电泳SDS(NR CE-SDS和R CE-SDS)和微粒计数(PC)中的任一种或组合,可以确定抗体单体和/或抗体聚集体的量。

#### [0130] 生产稳定抗体组合物的方法

本公开内容的方法生产稳定抗体组合物。这些稳定抗体组合物可以被称作ONS-5010。在某些实施方案中,ONS-5010包含抗体生物类似物、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、 $\alpha, \alpha'$ -海藻糖和聚山梨酯20。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物含有最小量的HMWS,随时间以较慢的速率积累HMWS,和/或在长期储存过程中维持小量的HMWS(例如,与其它抗体组合物相比)。

[0131] 通常, HMWS促进共价的非可逆聚集体的形成,所述非可逆聚集体减少抗体(例如,贝伐珠单抗)与在VEGF上的其表位的结合从而降低抗体的治疗效果。通常,限制HMWS的量会减小该问题并增强抗体的活性。另外,监管标准将贝伐珠单抗的抗体制剂中可允许的HMWS的量限制为在24个月后小于或等于8%。因此,合乎需要的是,限制稳定抗体组合物中HMWS的量,减慢HMWS随时间的积累,并在长期储存过程中维持小量的HMWS。

[0132] 在某些实施方案中,渗滤是本公开内容的稳定抗体组合物(例如,抗体生物类似物)的制造过程中的倒数第二个步骤的组成部分。通常,在渗滤过程中等于或高于6.2的pH值会增加抗体(例如,贝伐珠单抗)的制剂中的HMWS,从而造成HMWS随着时间的更大积累。因此,本公开内容提供了如下降低HMWS的渗滤方法:将浓缩组合物渗滤到包含海藻糖的交换溶液中,并且在渗滤后,通过添加磷酸盐组合物来快速调节组合物的pH。在某些实施方案中,磷酸盐组合物的添加会防止在稳定抗体组合物的制造和储存期间HMWS的产生和积累。

[0133] 本公开内容提供了一种生产稳定抗体组合物的方法。

[0134] 所述方法包括超滤起始组合物以产生浓缩组合物。在某些方面,所述起始组合物包含约4 mg/ml至6 mg/ml之间(包括端点)的抗体。在某些方面,所述起始组合物具有约4.7至约5.3的pH,包括端点。在某些方面,所述起始组合物的pH是约5.0。

[0135] 在某些方面,本公开内容的方法生产包含超滤起始组合物的稳定抗体组合物。在某些方面,本公开内容的方法采用包含抗体和起始缓冲液组合物、基本上由其组成或由其组成的起始组合物。在某些实施方案中,所述起始组合物包含约4 mg/ml至6 mg/ml之间的抗体、基本上由其组成或由其组成,所述抗体包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链。

[0136] 在某些方面,所述起始缓冲液组合物具有约5.0的pH。本公开内容的一种示例性起始缓冲液组合物包括、但不限于乙酸盐。在某些方面,所述起始缓冲液组合物具有约20至30

mS/cm之间的电导率,诸如约25 mS/cm。在某些方面,所述起始缓冲液组合物具有25 mS/cm的电导率。在某些方面实施方案,所述起始缓冲液组合物包含一种或多种单价或二价金属离子,与不包含一种或多种单价或二价金属离子的组合物相比,所述金属离子的浓度不会降低抗体的稳定性。示例性的单价或二价(或双价)金属离子包括、但不限于氢(H)、锂(Li)、钠(Na)、镁(Mg)、钾(K)、钙(Ca)、锰(Mn)、铁(Fe)、钴(Co)和锌(Zn)。

[0137] 在某些方面,本公开内容的方法可以被称作超滤/渗滤(UF/DF)。通常,膜大小、材料和负载可能影响在UF/DF过程中的蛋白吸附或保留。在某些方面,本公开内容的方法使用聚醚砜膜。在某些方面,本公开内容的方法使用具有30kD分子量孔径的膜。膜负载通常是期望的过程时间和渗透通量(随时间的渗透物体积)的一个因素,其可能影响从UF/DF获得的产物的质量。渗透通量通常受进料速率(LMH)、渗余物压强/跨膜压强和材料粘度影响。在某些实施方案中,所述膜承载 $\leq 1000 \text{ g/m}^2$ 、 $\leq 750 \text{ g/m}^2$ 、 $\leq 500 \text{ g/m}^2$ 或 $\leq 250 \text{ g/m}^2$ 的负载。在某些实施方案中,所述膜承载 $\leq$ 约500  $\text{g/m}^2$ 至 $\leq$ 约100  $\text{g/m}^2$ 的负载。在某些实施方案中,所述膜承载 $\leq$ 约300  $\text{g/m}^2$ 的负载。在某些方面,在本公开内容的方法中使用 $\leq 450$  LMH的进料流速。在某些方面,在本公开内容的方法中使用375 LMH的进料流速。在某些方面,在本公开内容的方法中使用 $\leq 25$  psi的渗余物压强。在某些方面,在本公开内容的方法中使用5 psi的渗余物压强。在某些方面,在本公开内容的方法中使用 $\leq 20$  psig的TMP。在某些方面,在本公开内容的方法中使用15 psig的TMP。

[0138] 在某些方面,在渗滤之前可以超滤本公开内容的组合物(例如,起始组合物、浓缩组合物、海藻糖组合物)。在某些方面,在渗滤之前可以通过超滤来浓缩本公开内容的组合物。在某些方面,超滤产生包含约30至40 mg/ml之间(包括端点)的抗体的浓缩组合物。

[0139] 渗滤可用于除去或降低本公开内容的组合物或制剂中的盐或溶剂的浓度。渗滤可以是连续的或不连续的。再生纤维素膜或聚醚砜膜可用于渗滤。通常,这些膜或盒具有宽pH和温度范围。用于渗滤的膜通常以多种分子量截止值得到,包括1 kDa、30 kD和100 kD。在某些方面,本公开内容的方法采用具有30 kD分子量孔径的膜。可以在渗滤之前平衡这些膜。在某些方面,用乙酸钠平衡膜。在某些方面,使用约25 mM乙酸钠平衡膜。在某些方面,用氯化钠平衡膜。在某些方面,使用约240 mM氯化钠平衡膜。在某些方面,使用237 mM氯化钠。在某些方面,用海藻糖溶液平衡膜。在某些方面,所述海藻糖溶液包含约6%海藻糖。在某些方面,所述海藻糖溶液包含海藻糖水溶液。还可以将膜平衡至期望的pH和电导率。在某些方面,将膜平衡至约4.5至5.5之间的pH,诸如约5.0。在某些方面,将膜平衡至约20至30 mS/cm之间的电导率,诸如约25 mS/cm。

[0140] 在某些方面,渗滤包含用交换溶液交换浓缩组合物的起始缓冲液组合物。在某些实施方案中,所述交换溶液可以是水性的。在某些方面,所述交换溶液包含海藻糖。在某些实施方案中,所述交换溶液包含约4%至约8%海藻糖(w/v),包括端点。在某些方面,所述交换溶液包含6%海藻糖(w/v)水溶液。在某些方面,所述海藻糖是 $\alpha, \alpha'$ -海藻糖。在某些方面,所述交换溶液包含聚山梨酯,作为一个非限制性例子,包括聚山梨酯20。在某些方面,使用包含约10%的聚山梨酯的聚山梨酯组合物产生在交换组合物和/或海藻糖组合物中约0.03%至约0.05%聚山梨酯20的终浓度。在某些方面,所述交换溶液和/或海藻糖组合物包含0.04%聚山梨酯的终浓度。在某些方面,在渗滤过程中可以使用 $\geq 5$ 个渗透体积的交换溶液。作为一个非限制性例子,使用的交换溶液的量可以是5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、

6.0、6.5、7.0、7.5或8.0个渗透体积。

[0141] 在某些方面,所述海藻糖组合物包含约30 g/L至40 g/L之间(包括端点)的抗体。在某些方面,所述海藻糖组合物包含约35 g/L的抗体。在某些实施方案中,所述海藻糖组合物包含35 g/L的抗体。

[0142] 在某些方面,所述海藻糖组合物具有约4.7至约5.3的pH,包括端点。在某些方面,所述海藻糖组合物的pH是约5.0。

[0143] 可以采用其它工艺步骤来提高UF/DF的产物的回收率或改善其质量。例如,产物损失可能是由渗透物的损失所致,这是由于产物已经穿过膜、结合到膜上并且在回收之前无法解吸附、或者产物以其它方式在系统中损失。回收程序可以使用空气、缓冲液或重力辅助。作为一个非限制性例子,缓冲液再循环可用于浓缩产物并提高回收率。缓冲液再循环方法也可用于使膜去极化并改善产物混合。在某些实施方案中,使用 $\leq 30$  psig的再循环压强。在某些实施方案中,再循环时间可以 $\leq 60$ 分钟。在某些实施方案中,再循环时间是约10分钟。活塞流冲洗或追赶可用于回收在设备或系统中损失的产物。该程序可用于从系统冲洗产物(蛋白,例如抗体)。在某些方面,可以选择用于活塞流冲洗或追赶中的6% $\alpha, \alpha'$ -海藻糖的体积以产生约30 g/L的蛋白浓度。在某些方面,可以选择用于活塞流冲洗或追赶的体积以产生约28.5至约31.5 g/L的蛋白浓度,包括端点。

[0144] 在某些实施方案中,本公开内容的方法也包括使所述海藻糖组合物与磷酸盐组合物接触以产生调过pH的组合物。

[0145] 在某些方面,所述接触步骤具有在约1秒至3600秒之间的持续时间,包括端点。在某些方面,所述接触步骤具有在约1500至2100秒之间的持续时间,包括端点。在某些方面,所述接触步骤具有约1800秒的持续时间。本领域已知的方法可以用于增加发生接触的速率。示例性的方法可以包括、但不限于向海藻糖组合物施加热、压强或搅拌。在某些实施方案中,热、压强或搅拌可以用于磷酸盐组合物。

[0146] 在某些方面,所述磷酸盐组合物具有约5.5至约5.9的pH,包括端点。在某些方面,所述磷酸盐组合物具有约5.7的pH。在某些这样的方面,所述磷酸盐组合物具有5.74的pH。

[0147] 在某些实施方案中,本公开内容的磷酸盐组合物包含磷酸钠。在某些方面,所述磷酸盐组合物包含约450 mM至550 mM之间(包括端点)的磷酸钠。在某些方面,所述磷酸盐组合物包含约500 mM的磷酸钠。在某些这样的方面,所述磷酸盐组合物包含510 mM的磷酸钠。

[0148] 在某些方面,所述磷酸钠是磷酸二氢钠。在某些方面,所述磷酸钠是磷酸氢二钠。在某些实施方案中,所述磷酸钠包含磷酸二氢钠和磷酸氢二钠。在某些方面,所述磷酸盐组合物包含约50至60 g/L之间(包括端点)的磷酸二氢钠。在某些方面,所述磷酸盐组合物包含约55 g/L磷酸二氢钠。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含58 g/L磷酸二氢钠。在某些方面,所述磷酸盐组合物包含约10至20 g/L之间(包括端点)的磷酸氢二钠。在某些方面,所述磷酸盐组合物包含约15 g/L磷酸氢二钠。在某些实施方案中,所述磷酸盐组合物包含12 g/L磷酸氢二钠。

[0149] 在某些方面,所述磷酸盐组合物包含约40至80 g/L之间的 $\alpha, \alpha'$ -海藻糖,诸如在约50至70 g/L $\alpha, \alpha'$ -海藻糖之间。在某些方面,所述磷酸盐组合物包含约60 g/L $\alpha, \alpha'$ -海藻糖。

[0150] 在某些方面,所述调过pH的组合物中磷酸钠的终浓度是在约40 mM至约60 mM之间,包括端点。在某些方面,所述调过pH的组合物中磷酸钠的终浓度是在45 mM至55 mM之

间,包括端点。在某些方面,所述调过pH的组合物中磷酸钠的终浓度是约50 mM。在某些方面,所述调过pH的组合物中磷酸钠的终浓度是51 mM或是约51 mM。

[0151] 在某些方面,所述调过pH的组合物pH是在约5.9至约6.3之间,包括端点。在某些方面,所述调过pH的组合物pH是在5.9至6.3之间,包括端点。在某些方面,所述调过pH的组合物pH是6.2或是约6.2。

[0152] 在某些实施方案中,本公开内容的方法包括配制用于递送给受试者的调过pH的组合物以产生稳定抗体组合物。在某些方面,所述配制步骤包括添加水溶液(磷酸盐和/或聚山梨酯溶液)。在某些方面,所述配制步骤包括添加非离子型表面活性剂(聚山梨酯20)。

[0153] 在某些方面,所述调过pH的组合物包含约3.0%至约3.5%HMWS,包括端点。在某些方面,所述调过pH的组合物包含约3.20%、约3.25%、约3.30%、约3.35%、约3.40%、约3.45%或约3.50%HMWS。在某些方面,所述调过pH的组合物包含3.20%、3.25%、3.30%、3.35%、3.40%、3.45%或3.50%HMWS。

[0154] 在某些实施方案中,本公开内容的方法包括配制用于递送给受试者的调过pH的组合物以产生稳定抗体组合物。在某些方面,配制包括使调过pH的组合物与聚山梨酯组合物接触。

[0155] 在某些方面,所述聚山梨酯组合物包含聚山梨酯20。

[0156] 在某些方面,所述聚山梨酯组合物包含约10%的聚山梨酯。在某些实施方案中,所述聚山梨酯组合物用于在稳定抗体组合物中产生约0.03%至约0.05%聚山梨酯20的终浓度。在某些方面,所述稳定抗体组合物包含0.04%聚山梨酯的终浓度。

[0157] 在某些方面,本公开内容提供了一种稳定抗体组合物,其包含25 g/L的包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链的抗体、5.8 g/L磷酸二氢钠一水合物、1.2 g/L无水磷酸氢二钠、60.0 g/L脱水 $\alpha, \alpha'$ -海藻糖和0.04%(v/v)聚山梨酯20。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包含 $\leq$ 6%HMWS。

[0158] 在某些方面,所述稳定抗体组合物具有约22.5 g/L至27.5 g/L之间的抗体终浓度,包括端点。在某些方面,所述稳定抗体组合物具有约25 g/L的抗体终浓度。在某些方面,所述稳定抗体组合物具有约0.04%聚山梨酯20的终浓度。在某些方面,所述稳定抗体组合物具有0.04%聚山梨酯20的终浓度。在某些实施方案中,在稳定抗体组合物所包含的抗体中包括活性天然形式的抗体单体的百分比,以及具有降低的或不具有肿瘤坏死结合活性的抗体片段、抗体聚集体和变性的或部分地变性的抗体的百分比。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物包括最大量的功能性抗体单体和最小量的具有降低的结合活性和/或治疗效果(与未改变的单体相比)的抗体片段、聚集体和在结构上改变的抗体形式。

[0159] 在某些方面,所述稳定抗体组合物包含约3.0至约6.0%HMWS,包括端点。在某些方面,所述稳定抗体组合物包含约3.20%、约3.25%、约3.30%、约3.35%、约3.40%、约3.45%、约3.50%、约4.00%、约4.50%或约6.00%HMWS。

[0160] 在某些方面,所述稳定抗体组合物在配制步骤以后每个月积累0.25%至0.50%之间(包括端点)的HMWS。在某些方面,所述稳定抗体组合物维持 $\leq$ 15%、 $\leq$ 12%、 $\leq$ 10%、 $\leq$ 8%、 $\leq$ 7%、 $\leq$ 6%或 $\leq$ 5%HMWS至少12、至少16、至少18、至少24、至少30或至少36个月。在某些方面,所述稳定抗体组合物在配制步骤结束后超过24个月包含 $\leq$ 8%HMWS。

[0161] 在某些方面,所述稳定抗体组合物包含0.5%至2.5%之间(包括端点)的SEQ ID NO:

1的氨基酸序列或SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的甲硫氨酸残基的氧化。在某些方面,所述稳定抗体组合物包含 $\leq 2.5\%$ 的SEQ ID NO: 1的氨基酸序列或SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的甲硫氨酸残基的氧化。在某些方面,所述SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的甲硫氨酸残基的氧化包含在SEQ ID NO: 1的位置258处的甲硫氨酸的氧化。

[0162] 在某些方面,所述稳定抗体组合物具有约5.9至约6.3的pH,包括端点。在某些方面,所述稳定抗体组合物具有约6.1的pH。在某些实施方案中,所述稳定抗体组合物具有6.1的pH。

[0163] 在某些方面,在配制步骤结束后或在稳定抗体组合物的制备日期后60天内 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存稳定抗体组合物。在配制步骤结束后或在稳定抗体组合物的制备日期后30天内可以在 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存稳定抗体组合物。在配制步骤结束后或在稳定抗体组合物的制备日期后15天内可以在 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存稳定抗体组合物。在某些实施方案中,本公开内容的组合物,例如,稳定抗体组合物,可以在这样的温度储存至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约12个月、至少约15个月、至少约18个月、至少约21个月、至少约24个月或之间的任何最小月数。在某些实施方案中,在储存期间,所述抗体是稳定的并且表现出HMWS的最小积累,使得稳定抗体组合物可以从储存在取出,施用给患者,且仍然对施用所述稳定抗体组合物所针对的病况表现出治疗效果。

#### [0164] 治疗方法

在某些实施方案中,本公开内容的组合物和制剂包含治疗有效量的抗体。治疗有效量可以变化,取决于抗体施用后所治疗的疾病或病况,和/或取决于向其施用抗体的受试者的特征,诸如年龄、性别、高度、重量、疾病或病况的进展状态或阶段、以前施用的数目和效力、给受试者施用的其它治疗剂以及从业人员已知的或在确定适当剂量时以其它方式考虑的其它特征。通常,治疗有效量是有效地治疗癌症诸如非鳞状非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤、肾细胞癌、宫颈癌或上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌的量。在某些方面,本公开内容的组合物可以用于治疗结肠癌、肺癌、胶质母细胞瘤、直肠癌、脑肿瘤和肾细胞癌。

[0165] 在某些方面,本公开内容的组合物可以用于治疗眼病况或病症,包括、但不限于视网膜、巩膜、玻璃体、晶状体、瞳孔、虹膜、角膜、脉络膜、视神经、视网膜脉管系统、睫状体或眼角的那些。在某些实施方案中,所述眼角包含小梁网和相关的结构。在某些方面,本公开内容的组合物可以用于治疗其中血管内皮生长因子(VEGF)上调、失调或过度活跃的眼病况或病症。在某些方面,本公开内容的组合物可以用于治疗眼病况或病症,包括、但不限于,年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、近视性变性、特发性脉络膜新生血管形成、炎症性脉络膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、息肉样脉络膜血管病变、眼新生血管形成、视网膜分支静脉闭塞(BRVO)、视网膜中央静脉闭塞、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、视网膜炎、色素性视网膜炎、斯塔加特病、乌谢尔综合征、视网膜变性、眼内炎、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、特发性近中心凹毛细血管扩张、格子样变性、黄斑裂孔、持久性胎儿脉管系统、视网膜动脉阻断和视网膜母细胞瘤。在某些方面,本公开内容的组合物可以用于治疗眼病况或病症,包括、但不限于,年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性和新生血管年龄相关性黄斑变性。

[0166] 在某些方面,用本公开内容的稳定抗体组合物治疗湿性年龄相关性黄斑变性的方法包括抑制、预防或减少眼中的血管生长。在某些方面,用本公开内容的稳定抗体组合物治

疗湿性年龄相关性黄斑变性的方法包括抑制、预防或减少眼中的血管形成。

[0167] 本公开内容的稳定抗体组合物可以通过任何适当的途径施用,包括、但不限于口服途径、静脉内途径、肌肉内途径、局部、皮下、脉络膜上、经由滴眼剂、和通过粘膜组织直接吸收。在某些方面,本公开内容的稳定抗体组合物可以作为用于静脉内输注的溶液施用。在某些方面,本公开内容的稳定抗体组合物可以作为玻璃体内注射施用。在某些方面,本公开内容的稳定抗体组合物可以作为玻璃体内输注施用。

[0168] 在某些方面,可以每2周施用本公开内容的稳定抗体组合物。在某些方面,可以每15天施用本公开内容的稳定抗体组合物。在某些方面,可以每个月2次施用本公开内容的稳定抗体组合物。限制抗体组合物中HMWS的百分比可能会降低实现治疗效果所需的剂量施用频率。本公开内容的方法可以产生每15-30天施用的组合物。本公开内容的方法可以产生约每20天施用的组合物。本公开内容的方法可以产生大约每三、四、五或六周施用的组合物。本公开内容的方法可以产生每个月一次或每两个月一次施用的组合物。在某些方面,可以将公开内容的稳定抗体组合物施用52周。在某些方面,可以将本公开内容的稳定抗体组合物施用约50周。在某些方面,可以将本公开内容的稳定抗体组合物施用4周、8周、16周、24周、36周或48周。在某些方面,可以将稳定抗体组合物施用4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20或25次。限制稳定抗体组合物中%HMWS的量可能会降低实现治疗效果所需的剂量施用的量、持续时间或频率。

[0169] 在某些方面,本公开内容的稳定抗体组合物具有11-50天的近似半衰期。在某些方面,本公开内容的稳定抗体组合物具有20天的近似半衰期。限制稳定抗体组合物中%HMWS的量可能增加它们的半衰期。本公开内容的方法可以产生这样的组合物:其半衰期比通过常规方法产生的抗体组合物长1、2、3、4、5、10、15、20或更多天。

[0170] 合适的组合物可以含有抗体异形体或它们的组合以及一种或多种药学上可接受的载体和/或药学上可接受的赋形剂。

[0171] 本发明的特征还在于通过施用治疗有效量的本文描述或举例说明的任何抗体制剂而在有此需要的受试者中治疗肿瘤的方法。优选地,将所述抗体制剂用在治疗癌症诸如铂抗性的复发性上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌、持续性、复发性或转移性宫颈癌、转移性结直肠癌、转移性HER2阴性的乳腺癌、转移性肾细胞癌、胶质母细胞瘤或非小细胞肺癌(NSCLC)的方法中。例如,通过在施用的制剂中存在的贝伐珠单抗抗体达到治疗效果。抗体制剂的施用可以根据任何合适的途径,优选通过注射,且更优选通过静脉内注射。施用可以在医学从业人员的指导或监督下进行。

[0172] 本发明的特征还在于通过施用治疗有效量的本文描述或举例说明的任何抗体制剂而在有此需要的受试者中治疗眼病况或病症的方法。优选地,将所述抗体制剂用在治疗眼病况或病症的方法中,包括、但不限于视网膜、巩膜、玻璃体、晶状体、瞳孔、虹膜、角膜、脉络膜、视神经、视网膜脉管系统、睫状体或眼角(包括小梁网和相关的结构)的那些。在某些方面,本公开内容的组合物可以用于治疗其中血管内皮生长因子(VEGF)上调、失调或过度活跃的眼病况或病症。在某些方面,本公开内容的组合物可以用于治疗眼病况或病症,包括、但不限于,年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、近视性变性、特发性脉络膜新生血管形成、炎症性脉络膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、息肉样脉络膜血管病变、眼新生血管形成、视网膜分支静脉闭塞

(BRVO)、视网膜中央静脉闭塞、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、视网膜炎、色素性视网膜炎、斯塔加特病、乌谢尔综合征、视网膜变性、眼内炎、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、特发性近中心凹毛细血管扩张、格子样变性、黄斑裂孔、持久性胎儿脉管系统、视网膜动脉阻断和视网膜母细胞瘤。在某些方面，本公开内容的组合物可以用于治疗眼病况或病症，包括、但不限于，年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性和新生血管年龄相关性黄斑变性。

[0173] 本文描述和举例说明的抗体制剂可以用作药物。本文描述和举例说明的抗体制剂可以用于制备药物，所述药物用于治疗癌症诸如铂抗性的复发性上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌、持续性、复发性或转移性宫颈癌、转移性结直肠癌、转移性HER2阴性的乳腺癌、转移性肾细胞癌、胶质母细胞瘤或非小细胞肺癌(NSCLC)中的一种或多种。所述制剂可以用于治疗铂抗性的复发性上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌。所述制剂可以用于治疗持续性、复发性或转移性宫颈癌。所述制剂可以用于治疗转移性结直肠癌。所述制剂可以用于治疗转移性HER2阴性的乳腺癌。所述制剂可以用于治疗转移性肾细胞癌。所述制剂可以用于治疗胶质母细胞瘤。所述制剂可以用于治疗非小细胞肺癌(NSCLC)。本文描述和举例说明的抗体制剂可以用于制备药物，所述药物用于治疗眼病况或病症中的一种或多种，包括、但不限于视网膜、巩膜、玻璃体、晶状体、瞳孔、虹膜、角膜、脉络膜、视神经、视网膜脉管系统、睫状体或眼角(包括小梁网和相关的结构)的那些。在某些方面，本公开内容的制剂可以用于治疗其中血管内皮生长因子(VEGF)上调、失调或过度活跃的眼病况或病症。在某些方面，本公开内容的制剂可以用于治疗眼病况或病症，包括、但不限于，年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、近视性变性、特发性脉络膜新生血管形成、炎症性脉络膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、息肉样脉络膜血管病变、眼新生血管形成、视网膜分支静脉闭塞(BRVO)、视网膜中央静脉闭塞、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、视网膜炎、色素性视网膜炎、斯塔加特病、乌谢尔综合征、视网膜变性、眼内炎、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、特发性近中心凹毛细血管扩张、格子样变性、黄斑裂孔、持久性胎儿脉管系统、视网膜动脉阻断和视网膜母细胞瘤。在某些方面，本公开内容的制剂可以用于治疗眼病况或病症，包括、但不限于，年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性和新生血管年龄相关性黄斑变性。

[0174] 本发明的特征还在于试剂盒。所述试剂盒可用于例如实施本文描述或举例说明的任何方法。在某些方面，试剂盒包含本文描述或举例说明的任何抗体制剂，以及关于在本文描述或举例说明的任何方法或用途中使用抗体制剂的说明书。所述试剂盒可以包含用于将抗体制剂注射进受试者的装置，包括、但不限于注射器和针头或导管。

[0175] 试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗铂抗性的复发性上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌的方法中施用抗体制剂的说明书，包括关于将抗体制剂注射进有此需要的铂抗性的复发性上皮卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌患者的说明书。在某些方面，试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗持续性、复发性或转移性宫颈癌的方法中施用抗体制剂的说明书，包括关于将抗体制剂注射进有此需要的持续性、复发性或转移性宫颈癌患者的说明书。在某些方面，试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗转移性结直肠癌的方法中施用抗体制剂的说明书，包括关于将抗体制剂注射进有此需要的转移性结直肠癌患者的说明书。在某些方面，试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗转移性HER2阴性的乳腺癌的

方法中施用抗体制剂的说明书,包括关于将抗体制剂注射进有此需要的转移性HER2阴性的乳腺癌患者的说明书。在某些方面,试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗转移性肾细胞癌的方法中施用抗体制剂的说明书,包括关于将抗体制剂注射进有此需要的转移性肾细胞癌患者的说明书。在某些方面,试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗胶质母细胞瘤的方法中施用抗体制剂的说明书,包括关于将抗体制剂注射进有此需要的胶质母细胞瘤患者的说明书。在某些方面,试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的方法中施用抗体制剂的说明书,包括关于将抗体制剂注射进有此需要的非小细胞肺癌(NSCLC)患者的说明书。试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗眼病况的方法中施用抗体制剂的说明书,所述眼病况包括、但不限于视网膜、巩膜、玻璃体、晶状体、瞳孔、虹膜、角膜、脉络膜、视神经、视网膜脉管系统、睫状体或眼角(包括小梁网和相关的结构)的那些。在某些方面,本公开内容的组合物可以用于治疗其中血管内皮生长因子(VEGF)上调、失调或过度活跃的眼病况或病症。在某些方面,试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗眼病况或病症的方法中施用抗体制剂的说明书,所述眼病况或病症包括、但不限于,年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME)、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、近视性变性、特发性脉络膜新生血管形成、炎症性脉络膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、息肉样脉络膜血管病变、眼新生血管形成、视网膜分支静脉闭塞(BRVO)、视网膜中央静脉闭塞、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、视网膜炎、色素性视网膜炎、斯塔加特病、乌谢尔综合征、视网膜变性、眼内炎、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、特发性近中心凹毛细血管扩张、格子样变性、黄斑裂孔、持久性胎儿脉管系统、视网膜动脉阻断和视网膜母细胞瘤。在某些方面,试剂盒附带的说明书可以包括关于在治疗眼病况或病症的方法中施用抗体制剂的说明书,所述眼病况或病症包括、但不限于,年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性和新生血管年龄相关性黄斑变性。

[0176] 提供以下实施例以更详细地描述本发明。它们旨在举例说明而非限制本发明。

#### [0177] 实施例1 - 材料和方法

简介. 抗体ONS-5010代表贝伐珠单抗的生物类似物,并且已经为了增强的储存稳定性而重新配制。据信,所述缓冲制剂至少可以在长期储存过程中减少抗体的聚集。据信,所述缓冲制剂可以减少贝伐珠单抗分子的非共价和共价二聚化。将作为阿伐他汀®(Genentech, Inc.)销售的贝伐珠单抗配制在磷酸钠缓冲液中,其包括海藻糖作为稳定剂,且包括温和表面活性剂和6.2的酸性pH。下面描述的实验方案包括为了增强的胶体稳定性而重新配制贝伐珠单抗的开发工作。通过改变缓冲液和pH值,实现了显著提高稳定性(特别是在减少聚集方面)。

[0178] 动态光散射(DLS). DLS试验方法使用Wyatt DynaPro™平板读数器来提供关于蛋白尺寸分布和溶液中总胶体稳定性的信息。流体动力学半径提供关于聚集的存在和溶液中分子结构的确认的信息。DLS试验提供了在非变性条件下溶液中的尺寸分布的正交测量。

[0179] 示差扫描量热法(DSC). 示差扫描量热法测量蛋白的熔解转变,并因此提供关于溶液中蛋白热稳定性的信息。使用GE VP毛细管DSC系统进行量热法。将蛋白以优化过的扫描速率从25°C加热到95°C,从而允许在蛋白解折叠的同时发生熔解转变(T<sub>m</sub>)。将缓冲液对照与样品一起加热,并用于计算熔解温度和转变。DSC概况是抗体的典型特征,并证明该蛋白折叠成独特的结构域。

[0180] 尺寸排阻色谱法 (SE-HPLC) . SE-HPLC用于监测抗体大小变体分布。SE-HPLC试验方法基于大小来分离蛋白。在单体峰之前洗脱的物质是聚集体 (HMWS),而在单体峰之后洗脱的峰是降解物 (LMWS)。

[0181] 如下分离物质:使用TSK3000SWx1 7.8mm x 300mm柱(Tosoh Bioscience目录号08541),流速为0.5mL/min,且运行时间为30分钟;柱在环境温度。流动相包含0.2M磷酸钾和0.25M氯化钾以及6.2的pH。存在两种样品注射形式-在25 mg/mL的纯净注射10uL,和在0.5 mg/mL的稀释注射100uL (纯净注射测量包括可逆聚集体在内的总聚集体,稀释注射测量主要是共价性质的二聚体)。将稀释样品用流动相A (0.2M磷酸钾, 0.25M氯化钾,pH 6.2) 稀释至0.5mg/mL。

[0182] 将样品温育24小时,然后在30°C分析。在整个运行持续期间将自动采样器温度维持在30°C。在280nm分析数据。

[0183] 阳离子交换色谱法 (CEX) . 将贝伐珠单抗样品在流动相A中稀释,并用羧肽酶B消化。使用阳离子交换HPLC柱分离物质。用流动相A和流动相B进行梯度洗脱,流速为0.5mL/分钟。柱温度保持在40°C,并将样品保持在2-8°C。在280nm分析数据。

[0184] 微粒含量(流体成像) . 流体成像(FI)系统是用于快速分析运动流体中的颗粒的集成系统。该系统自动对样品或连续流中的颗粒或细胞进行计数、成像和分析。在FI系统中,样品通过泵被吸入流室。FI系统以“自动图像模式”使用激光监测通过的颗粒的光散射。将照相机设置为以用户定义的间隔同步捕获图像。然后,由VisualSpreadsheet保存散射检测值(除了所有其它颗粒性能和图像以外)。计算机和数字信号处理器一起工作,以启动、检索和处理视场的图像。

[0185] 渗透压. 渗透压计用于借助于冰点测量来测量缓冲液和蛋白溶液的渗透压。它利用高精度热敏电阻来感测样品温度、控制过冷和冻结诱导的程度以及测量样品的冰点。每次测量需要的样品量为20μL。

[0186] 固有荧光. 固有荧光光谱法是一种非侵袭性的生物物理学表征方法,其提供关于蛋白的三级结构的信息。该方法测量蛋白结构的解折叠程度。在荧光波谱仪上确定蛋白样品的强度和最大波长(例如色氨酸发射)。每个重复试验600 μL的0.1mg/mL蛋白溶液。发射扫描:在295nm激发,在310nm开始,在450nm结束。

[0187] 基于HUVEC细胞的VEGF中和测定. 抗-血管生成单克隆抗体贝伐珠单抗的主要作用机制是与VEGF结合并阻止与其同源受体的结合。以此方式,贝伐珠单抗中和VEGF的诱导内皮细胞增殖的能力;因此,通过其抑制VEGF诱导的细胞增殖的能力,可以定量抗-VEGF抗体的效能。在基于HUVEC细胞的效能测定中,将固定浓度的VEGF与连续稀释的药物一起温育。贝伐珠单抗以剂量依赖性的方式结合VEGF,从而使得VEGF不可用于其它结合相互作用。然后将该药物-VEGF混合液添加给接种在多孔板中的HUVEC细胞,并进一步温育以继续增殖。在温育过程中,HUVEC细胞以VEGF浓度依赖性方式增殖。在低药物浓度,可获得更多的VEGF,且因此增殖高,反之亦然。通过在温育结束时定量活细胞的数量来评估HUVEC细胞增殖的抗体剂量依赖性抑制。VEGF中和测定是一种相对测定,其中相对于参考标准测量样品的效能。该测定由三个独立的测定板组成。在每个板中,使用统计软件将标准和样品的细胞生存力数据拟合到4P逻辑模型以生成具有独立曲线参数的S形曲线;对比标准和样品曲线参数,以评估曲线平行度,并在认为平行时,计算试验物的相对效能。最终报告的值是在可

接受的变异性范围内的三个独立值的平均值。

[0188] VEGF结合免疫测定. 抗-血管生成单克隆抗体贝伐珠单抗的主要作用机制是与VEGF结合并阻止与其同源受体的结合,从而抑制VEGF介导的对血管内皮细胞的促有丝分裂作用。贝伐珠单抗对VEGF的这种中和作用会抑制血管生成过程,这进而抑制肿瘤存活和进展。因此,通过在ELISA中测量其与VEGF的结合,可以定量抗-VEGF抗体的效能。在该测定中,首先将固定浓度的VEGF包被在多孔板上。封闭非特异性的结合位点以后,使固定的VEGF与连续稀释的参考标准和试验样品反应。洗掉未结合的抗体,并将孔与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗- $\kappa$ 轻链抗体(其结合VEGF-抗体复合物)一起温育。接下来,将未结合的第二抗体洗掉,并将孔与3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB) HRP底物一起温育以产生有色产物。加入磷酸使显色淬灭,并读取吸光度值。获得的光密度(O.D.)值与结合VEGF的样品的量成正比。VEGF结合测定是一种相对测定,其中相对于参考标准测量样品的效能。该测定法由两个独立的测定板组成。在每个板中,使用统计软件将标准和样品的O.D. 数据拟合到4P逻辑模型以生成具有独立曲线参数的S形曲线;对比标准和样品曲线参数以评估曲线的平行度,并在认为平行时,计算出试验物的相对效能。最终报告的值是在可接受的变异性范围内的两个独立值的平均值。

[0189] 实施例2 -缓冲液、稳定剂和pH对贝伐珠单抗构象和胶体稳定性的影响

最初的实验评价了缓冲液组分对贝伐珠单抗的构象和胶体稳定性的影响。确定了柠檬酸盐、磷酸盐和乙酸盐缓冲液对于贝伐珠单抗的稳定性是理想的。此外,这些缓冲液单独显示出对贝伐珠单抗的聚集的保护作用,所述聚集由加热或摇动相关的应激诱导。进一步的实验评价了这些缓冲液(柠檬酸盐、磷酸盐和乙酸盐)的组合是否表现出优异的稳定作用。相对于贝伐珠单抗匹配组合物(与商购可得的阿伐他汀®制剂的制剂匹配)中的磷酸钠缓冲液,柠檬酸盐磷酸盐缓冲液产生了显著更低的聚集体(包括共价型二聚体)和更低的电荷物质。

[0190] 将海藻糖稳定剂在50 mM的磷酸钠缓冲液中的效果与替代稳定剂(包括蔗糖、山梨醇、甘露醇和甘氨酸)进行了对比。然后通过DSC评估了抗体在不同稳定缓冲液组合物中的构象稳定性(图1)。这些数据列于表1中,并表明所有试验的稳定剂等于或优于海藻糖。

[0191] 表1. 在磷酸钠缓冲液中的替代构象稳定剂.

缓冲液条件	所有条件: 50mM的磷酸钠	最终缓冲液pH	T <sub>m1</sub>	T <sub>m2</sub>
1	海藻糖60 mg/mL (匹配)	6.20	73.3	83.5
2	海藻糖25 mg/mL	6.26	73.0	83.0
3	蔗糖25 mg/mL	6.13	72.9	82.9
4	蔗糖60 mg/mL	6.11	73.4	83.4
5	山梨醇25 mg/mL	6.19	73.1	82.9
6	山梨醇60 mg/mL	6.12	73.6	83.5
7	甘露醇25 mg/mL	6.19	73.0	83.2
8	甘露醇60 mg/mL	6.05	73.7	83.4
9	甘氨酸16 mg/mL	6.11	73.5	83.3
10	甘氨酸25 mg/mL	6.05	73.9	83.6

[0192] 替代稳定剂(蔗糖、山梨醇、甘露醇和甘氨酸)随后与柠檬酸盐磷酸盐缓冲液一起

使用,并通过DSC评估贝伐珠单抗抗体的构象稳定性。数据列于表2中,并表明柠檬酸盐磷酸盐缓冲液中的替代稳定剂等于或优于贝伐珠单抗匹配制剂。

[0193] 表2. 在柠檬酸盐磷酸盐 (C/P) 缓冲液中的替代构象稳定剂.

缓冲液条件	样品	pH	Tm1	Tm2
1	贝伐珠单抗匹配: 50 mM的磷酸钠, 海藻糖60 mg/mL	6.20	73.3	83.5
2	50 mM C/P蔗糖60克/mL	6.15	73.0	83.0
3	50 mM C/P山梨醇60 mg/mL	6.14	73.3	83.3
4	50 mM C/P甘露醇60 mg/mL	6.11	73.3	83.2
5	50 mM C/P甘氨酸25 mg/mL	6.1	73.5	83.6

[0194] 使用柠檬酸盐磷酸盐缓冲液和海藻糖作为稳定剂,评估了pH对抗体(贝伐珠单抗)的构象稳定性的影响。DSC用于测量抗体稳定性。在表3中给出的数据表明,在每种制剂组合中测得的贝伐珠单抗的解折叠温度与关于贝伐珠单抗匹配组合物观察到的解折叠温度相当,但仅在大于5.6的pH(5.6、5.8、6.0、6.2)才观察到。在较低的pH值(特别是5.0),在约65°C的较低温度发生早期解折叠事件,因此使得这样的较低pH值(低于5.6)不适用于贝伐珠单抗的制剂。

[0195] 表3. pH对50 mM柠檬酸盐或50 mM的柠檬酸盐磷酸盐缓冲液中的贝伐珠单抗热/构象稳定性的影响.

样品	最终缓冲液pH	Tm1	Tm2	Tm3
贝伐珠单抗匹配	6.20	73.4	83.5	
35mM柠檬酸盐海藻糖60 mg/mL pH 5.8	5.79	72.3	83.0	
50mM柠檬酸盐海藻糖60 mg/mL pH 5.0	4.99	65.3	71.1	79.6
50mM柠檬酸盐海藻糖60 mg/mL pH 5.2	5.13	71.5	80.9	
50mM柠檬酸盐海藻糖60 mg/mL pH 5.4	5.32	71.9	82.0	
50mM柠檬酸盐海藻糖60 mg/mL pH 5.6	5.51	72.1	82.4	
50mM柠檬酸盐海藻糖60 mg/mL pH 5.8	5.70	72.2	82.8	
50mM柠檬酸盐海藻糖60 mg/mL pH 6.0	5.93	72.3	82.8	
50mM柠檬酸盐海藻糖60 mg/mL pH 6.2	6.13	72.4	83.0	
50mM C/P海藻糖60 mg/mL pH 5.0	5.08	72.2	81.2	
50mM C/P海藻糖60 mg/mL pH 5.2	5.25	72.5	81.9	
50mM C/P海藻糖60 mg/mL pH 5.4	5.43	72.8	82.3	
50mM C/P海藻糖60 mg/mL pH 5.6	5.66	72.8	83.1	
50mM C/P海藻糖60 mg/mL pH 5.8	5.92	72.9	83.1	
50mM C/P海藻糖60 mg/mL pH 6.0	6.13	73.0	83.2	
50mM C/P海藻糖60 mg/mL pH 6.2	6.26	73.1	83.4	

[0196] 平行实验评价了乙酸盐作为缓冲剂。在5 mM、15 mM和25 mM的浓度评估乙酸盐,且pH值可变(表4和5)。这些实验对比了蔗糖(60 mg/ml)和海藻糖(60 mg/ml)作为稳定剂。然后通过DSC评估了每种组合物中的贝伐珠单抗分子的稳定性。数据见表4和表5。观察到,增加乙酸盐的摩尔浓度会降低Tm,并且增加pH也会降低Tm(表4和5)。对于pH 5.6和5.8,显示增强的构象稳定性(表5)。

[0197] 表4. 贝伐珠单抗在乙酸盐海藻糖缓冲制剂中的构象稳定性.

样品	最终pH	Tm1	Tm2
贝伐珠单抗匹配50 mM磷酸盐pH 6.2	6.20	73.4	83.5
5 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 5.6	5.51	74.2	83.3
15 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 5.6	5.52	73.9	83.3
25 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 5.6	5.56	73.8	83.0
5 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 5.8	5.78	74.1	83.5
15 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 5.8	5.77	74.0	83.3
25 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 5.8	5.76	73.8	83.3
5 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 6.0	5.93	74.1	83.6
15 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 6.0	5.91	73.9	83.4
25 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 6.0	5.97	73.8	83.7
5 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 6.2	6.11	74.1	83.8
15 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 6.2	6.15	73.8	83.8
25 mM乙酸盐159 mM海藻糖pH 6.2	6.14	73.6	83.8

[0198] 表5. 贝伐珠单抗在乙酸盐蔗糖缓冲制剂中的构象稳定性.

样品	实际缓冲液 pH	在 0.5 mg/mL 的 最终 pH	Tm1	Tm2
贝伐珠单抗匹配 50 mM 磷酸盐 pH 6.2	6.20	6.20	73.4	83.7
5 mM 乙酸盐 60 mg/mL 蔗糖 pH 5.6	5.57	5.72	74.1	83.4
15 mM 乙酸盐 60 mg/mL 蔗糖 pH 5.6	5.52	5.60	73.9	83.0
5 mM 乙酸盐 60 mg/mL 蔗糖 pH 5.8	5.76	5.92	74.1	83.4
15 mM 乙酸盐 60 mg/mL 蔗糖 pH 5.8	5.73	5.80	73.9	83.3

[0199] 实施例3 - 在柠檬酸盐磷酸盐缓冲的海藻糖和乙酸盐蔗糖制剂中的储存稳定性

选择四种缓冲制剂以评估贝伐珠单抗分子在18个月内的长期储存稳定性。这些制剂与贝伐珠单抗匹配/参考制剂(条件1)平行进行。储存条件如下:约25 mg/ml (纯净的)或稀释的抗体;在5°C、30°C或37°C储存;在室温以150 RPM摇动;和冷冻/融化(20°C至室温,进行三个循环)。下面列出了试验的制剂:

条件1:贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配

50 mM的磷酸钠

159 mM的海藻糖

0.04%聚山梨酯20

pH 6.20

用无菌注射用水补至适量

条件2: 贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐, pH 5.8

50 mM的柠檬酸盐磷酸盐

159 mM的海藻糖

0.04%聚山梨酯20

pH 5.80

用无菌注射用水补至适量

条件3: 贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐, pH 6.0

50 mM的柠檬酸盐磷酸盐

159 mM的海藻糖

0.04%聚山梨酯20

pH 6.0

用无菌注射用水补至适量

条件4: 贝伐珠单抗乙酸盐, pH 5.6

15 mM的乙酸盐

175 mM的蔗糖

0.04%聚山梨酯20

pH 5.60

用无菌注射用水补至适量

条件5: 贝伐珠单抗乙酸盐, pH 5.8

15 mM的乙酸盐

175 mM的蔗糖

0.04%聚山梨酯20

pH 5.80

用无菌注射用水补至适量。

[0200] 通过一系列常规分析和扩展表征测定,包括、但不限于尺寸排阻色谱法 (SEC)、阳离子交换色谱法 (CEX)、CE-SDS、基于HUVEC细胞的VEGF中和测定、VEGF结合免疫测定和微粒计数 (PC), 试验了抗体在每种储存条件下的稳定性。尺寸排阻色谱法用于评估抗体单体的百分比, 总聚集体 (共价和非共价) 的百分比以及降解物的百分比。与贝伐珠单抗 (阿伐他汀®) 参照/匹配组合物一起, 评估了两种制剂类型的相对稳定性。在 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  储存18个月的长期储存稳定性样品指示, 基于柠檬酸盐磷酸盐的组合物 (条件2和3) 和基于乙酸盐缓冲液的组合物 (条件4和5) 都比阿伐他汀® 匹配组合物更稳定 (图2A; 图2A (i); 图2A (ii); 表6)。图2B、图2B (i)、图2B (ii) 和表7指示, 在所有五种贝伐珠单抗生物类似物组合物中均存在测得的共价二聚体, 但是在条件2、3、4和5下的共价二聚体低于在贝伐珠单抗匹配组合物 (条件1) 中存在的共价二聚体 (表7)。

[0201] 表6. 通过SE-HPLC (纯净注射) 测得的贝伐珠单抗生物类似物制剂 (在 $5^{\circ}\text{C}$  的长期稳定性) 中的总聚集体。

制剂组合物	%聚集体				
时间(在 5°C)	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
<b>T0</b>	<b>6.0</b>	<b>3.1</b>	<b>3.5</b>	<b>5.7</b>	<b>6.2</b>
<b>2 个月</b>	<b>6.3</b>	<b>3.4</b>	<b>3.8</b>	<b>3.4</b>	<b>4.9</b>
<b>3.5 个月</b>	<b>6.3</b>	<b>3.3</b>	<b>3.9</b>	<b>3.4</b>	<b>4.9</b>
<b>7 个月</b>	<b>6.5</b>	<b>3.5</b>	<b>4.0</b>	<b>3.6</b>	<b>4.9</b>
<b>12 个月</b>	<b>6.4</b>	<b>3.4</b>	<b>4.0</b>	<b>3.0</b>	<b>4.1</b>
<b>18 个月</b>	<b>7.0</b>	<b>3.9</b>	<b>4.3</b>	<b>3.4</b>	<b>4.6</b>

[0202] 表7. 通过SE-HPLC (稀释注射)测得的贝伐珠单抗生物类似物制剂(长期稳定性)中的共价二聚体.

制剂组合物	%共价二聚体				
时间(在 5°C)	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
<b>T0</b>	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>
<b>3.5 个月</b>	<b>2.0</b>	<b>2.4</b>	<b>1.9</b>	<b>2.3</b>	<b>2.0</b>
<b>7 个月</b>	<b>2.5</b>	<b>2.2</b>	<b>2.5</b>	<b>2.1</b>	<b>2.2</b>
<b>12 个月</b>	<b>2.4</b>	<b>2.1</b>	<b>2.1</b>	<b>1.7</b>	<b>1.9</b>
<b>18 个月</b>	<b>2.9</b>	<b>2.5</b>	<b>2.6</b>	<b>2.1</b>	<b>2.3</b>

[0203] 在18个月长储存稳定性研究中还对所有样品试验了通过阳离子交换色谱法(CEX)测量的酸性带电物质(表7 (i);图2B (iii);图2B (iv)和图2B (v)).在所有5种组合物中,带电物质(特别是酸性带电物质)在5°C的18个月储存中没有明显变化.

[0204] 表7 (i). 通过CEX-HPLC测量的贝伐珠单抗生物类似物制剂(长期稳定性)中的%酸性物质.

制剂组合物	%酸性物质				
时间(在 5°C)	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
<b>T0</b>	<b>22.9</b>	<b>25.7</b>	<b>26.5</b>	<b>26.9</b>	<b>26.7</b>
<b>3.5 个月</b>	<b>28.3</b>	<b>27.9</b>	<b>28.1</b>	<b>28.4</b>	<b>27.9</b>
<b>7 个月</b>	<b>29.2</b>	<b>28.8</b>	<b>29.1</b>	<b>29.4</b>	<b>29.4</b>
<b>12 个月</b>	<b>29.7</b>	<b>28.6</b>	<b>29.0</b>	<b>29.5</b>	<b>28.9</b>
<b>18 个月</b>	<b>28.7</b>	<b>27.3</b>	<b>27.3</b>	<b>27.6</b>	<b>27.4</b>

[0205] 与条件1相比,发现对于所有条件(条件2-5)通过基于HUVEC细胞的VEGF中和测定测得的贝伐珠单抗生物类似物制剂的相对效能是在90-110%以内(表7 (ii)).该发现还证实了制剂(条件2-5)的效能不会由于制剂组合物的改变而受到影响,并且在2-8°C的18个月储存中等同于阿伐他汀组合物的制剂.

[0206] 表7 (ii). 在2-8°C储存18个月以后通过基于HUVEC细胞的VEGF中和测定测得的贝伐珠单抗生物类似物制剂(条件1-5)的相对效能.

样品描述	相对于条件1的相对效能
条件1	100
条件2	103
条件3	101
条件4	100
条件5	99

[0207] 与条件1相比,发现对于所有条件(条件2-5)通过VEGF结合免疫测定测得的贝伐珠单抗生物类似物制剂的相对效能是在90 - 100%以内(表7(iii)).该发现还证实了制剂(条件2-5)的效能不会由于制剂组合物的改变而受到影响,并且在2-8°C的18个月储存中等同于阿伐他汀组合物的制剂。

[0208] 表7 (iii). 在2-8°C储存18个月以后通过VEGF结合免疫测定测得的贝伐珠单抗生物类似物制剂(条件1-5)的相对效能.

样品描述	相对于条件1的相对效能
条件1	100%
条件2	95%
条件3	93%
条件4	97%
条件5	97%

[0209] 加速储存稳定性(30°C)的样品指示,基于柠檬酸盐磷酸盐的组合物和基于乙酸盐缓冲液的组合物都比贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配组合物更稳定(图2C和图2D;表8和9)。图2D和表9指示,在所有五种贝伐珠单抗生物类似物组合物中均存在可测量的共价二聚体。发现所有生物类似物制剂条件(2-5)具有比在贝伐珠单抗匹配组合物中存在的那些更低的共价二聚体。

[0210] 表8. 通过SE-HPLC (纯净注射)测得的在贝伐珠单抗生物类似物制剂(在30°C的加速稳定性)中的总聚集体.

制剂组合物	%聚集体				
	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
时间(在 30°C)					
<b>T0</b>	<b>6.0</b>	<b>3.1</b>	<b>3.5</b>	<b>5.7</b>	<b>6.2</b>
第 7 天	<b>6.1</b>	<b>3.3</b>	<b>3.3</b>	<b>3.8</b>	<b>5.3</b>
第 14 天	<b>6.6</b>	<b>3.5</b>	<b>4.1</b>	<b>3.9</b>	<b>5.7</b>
3.5 个月	<b>8.3</b>	<b>4.6</b>	<b>5.3</b>	<b>4.1</b>	<b>6.2</b>

[0211] 表9. 通过SE-HPLC (稀释注射)测得的在贝伐珠单抗生物类似物制剂(在30°C的加速稳定性)中的共价二聚体.

制剂条件	%共价二聚体				
时间(在 30°C)	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
<b>T0</b>	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>
<b>2 个月</b>	<b>3.6</b>	<b>2.8</b>	<b>3.0</b>	<b>2.3</b>	<b>2.5</b>
<b>3.5 个月</b>	<b>4.0</b>	<b>3.2</b>	<b>3.7</b>	<b>2.7</b>	<b>3.2</b>

[0212] 加速储存稳定性 (37°C) 的样品指示, 基于柠檬酸盐磷酸盐的组合物和基于乙酸盐缓冲液的组合物都比贝伐珠单抗匹配组合物更稳定 (图2E和图2F; 表10和11)。图2F和表11指示可测量的共价二聚体在所有五种贝伐珠单抗生物类似物组合物中的存在。尽管如此, 所有条件 (2-5) 具有比在贝伐珠单抗匹配组合物中存在的那些更低的共价二聚体。

[0213] 表10. 通过SE-HPLC (纯净注射) 测得的在贝伐珠单抗生物类似物制剂 (在37°C的加速稳定性) 中的总聚集体。

制剂组合物	%聚集体				
时间(在 37°C)	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
<b>T0</b>	<b>6.0</b>	<b>3.1</b>	<b>3.5</b>	<b>5.7</b>	<b>6.2</b>
<b>第 7 天</b>	<b>6.7</b>	<b>3.4</b>	<b>4.0</b>	<b>3.9</b>	<b>5.7</b>
<b>第 14 天</b>	<b>7.3</b>	<b>3.9</b>	<b>4.6</b>	<b>4.0</b>	<b>6.2</b>
<b>第 21 天</b>	<b>7.8</b>	<b>4.2</b>	<b>4.9</b>	<b>4.3</b>	<b>6.2</b>
<b>第 28 天</b>	<b>8.3</b>	<b>4.4</b>	<b>5.1</b>	<b>4.2</b>	<b>5.6</b>
<b>2 个月</b>	<b>9.9</b>	<b>5.2</b>	<b>5.9</b>	<b>4.6</b>	<b>6.4</b>

[0214] 表11. 通过SE-HPLC (稀释注射) 测得的在贝伐珠单抗生物类似物制剂 (在37°C的加速稳定性) 中的共价二聚体。

制剂组合物	%共价二聚体				
时间(在 37°C)	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
<b>T0</b>	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>
<b>2 个月</b>	<b>5.1</b>	<b>3.7</b>	<b>3.8</b>	<b>3.0</b>	<b>3.2</b>

[0215] 进行应激试验 (在室温在150 rpm摇动) 的样品指示, 基于柠檬酸盐磷酸盐的组合物和基于乙酸盐缓冲液的组合物都比贝伐珠单抗 (阿伐他汀®) 匹配组合物更稳定 (图2G和图2H; 表12和13)。乙酸盐-蔗糖组合物 (条件5) 具有略高的聚集体百分比, 指示5.6的pH对于贝伐珠单抗的制剂稳定性而言优于pH 5.8。图2H和表13指示在所有五种贝伐珠单抗生物类似物组合物中测得的共价二聚体。观察到所有条件 (2-5) 具有比在贝伐珠单抗 (阿伐他汀®) 匹配组合物中存在的那些更低的共价二聚体。

[0216] 表12. 通过SE-HPLC (纯净注射) 测得的在贝伐珠单抗生物类似物制剂 (在150 rpm摇动) 中的总聚集体。

制剂组合物 时间(在 150 rpm 摇动)	%聚集体				
	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
T0	6.0	3.1	3.5	5.7	6.2
第 7 天	6.4	3.3	3.9	4.0	5.3
第 14 天	6.5	3.2	4.0	4.0	6.0
第 21 天	6.7	3.8	4.3	4.2	5.7

[0217] 表13. 通过SE-HPLC (稀释注射)测得的在贝伐珠单抗生物类似物制剂(在150 rpm摇动)中的共价二聚体.

制剂组合物 时间(在 150 rpm 摇动)	%共价二聚体				
	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
T0	1.7	1.7	1.7	1.5	1.4
第 21 天	2.8	2.2	2.4	2.0	2.1

[0218] 进行应激试验(冷冻/融化试验)的样品指示,关于提供针对冷冻/融化应激的保护,基于柠檬酸盐磷酸盐的组合物和基于乙酸盐缓冲液的组合物等同于贝伐珠单抗(阿伐他汀®)匹配组合物(图2I和图2J;表14和15)。乙酸盐-蔗糖组合物(条件5)具有略高的聚集体百分比,指示5.6的pH对于贝伐珠单抗的制剂稳定性而言优于pH 5.8。图2J和表15指示可测量的共价二聚体在所有五种贝伐珠单抗生物类似物组合物中的存在。所有条件(2-5)具有比在贝伐珠单抗匹配组合物中存在的那些更低的共价二聚体。

[0219] 表14. 通过SE-HPLC (纯净注射)测得的在贝伐珠单抗生物类似物制剂(在150 rpm摇动)中的总聚集体.

制剂组合物 冷冻/融化应激试验	%聚集体				
	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
T0	6.0	3.1	3.5	5.7	6.2
循环 1 RT/-20°C	6.1	3.1	3.8	3.7	5.2
循环 3 RT/-20°C	6.2	3.2	3.7	3.6	5.8

[0220] 表15. 通过SE-HPLC (稀释注射)测得的在贝伐珠单抗生物类似物制剂(冷冻/融化应激)中的共价二聚体.

制剂条件 冷冻/融化应激试验	%共价二聚体				
	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4	条件 5
T0	1.7	1.7	1.7	1.5	1.4
循环 1 RT/-20°C	1.7	1.7	1.7	1.6	1.6
循环 3 RT/-20°C	1.7	1.6	1.8	1.6	1.7

[0221] 实施例4-在柠檬酸盐磷酸盐缓冲的海藻糖和乙酸盐蔗糖制剂中的贝伐珠单抗生

### 物类似物的生物物理性能

与贝伐珠单抗匹配参考制剂平行地评估了四种缓冲的生物类似物试验制剂的生物物理性能。评估了生物物理性能,包括、但不限于通过示差扫描量热法(DSC)、动态光散射(DLS)、荧光光谱法(Int. Fl.)试验的那些。通过几种正交工具评估了生物类似物的相似性,这些生物物理学方法是在正交分析方法中评估生物相似性的一种这样的方案。正交工具指示贝伐珠单抗生物类似物的四种缓冲制剂(条件2-5)的生物物理性能类似于或优于贝伐珠单抗匹配组合物(条件1)的生物物理性能。

[0222] 贝伐珠单抗在所有制剂中的熔解温度以及因此热解折叠模式是相似的,具有约73°C的Tm1和约83°C的Tm2(表16)。这指示,所有开发的制剂条件都提供与贝伐珠单抗相似的构象稳定性。最终是如实施例3中所述的长期稳定性研究(在5°C储存18个月),其最终将条件2-5鉴定为制剂(即组合物),其中贝伐珠单抗更稳定且更不易聚集。

[0223] 表16. 通过DSC测得的贝伐珠单抗生物类似物制剂组合物的构象稳定性.

制剂条件	样品	实际缓冲液pH	Tm1	Tm2
1	贝伐珠单抗匹配	6.2	73.3	83.3
2	贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐pH 5.8	5.8	72.8	82.8
3	贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐pH 6.0	6.0	72.4	82.9
4	贝伐珠单抗乙酸盐pH 5.6	5.6	73.5	83.1
5	贝伐珠单抗乙酸盐5.8	5.8	73.6	83.3

[0224] 与贝伐珠单抗匹配组合物(条件1)相比,评估了在所有四种制剂条件下贝伐珠单抗生物类似物的流体动力学性能的基于动态光散射(DLS)的评估。在条件1-3下,贝伐珠单抗生物类似物的流体动力学半径增加了约6 nm至7 nm(在15 mg/ml的浓度)(表17,图3)。与贝伐珠单抗匹配组合物(条件1)相比,乙酸盐条件4和5显示出明显的不同尺寸趋势,表明更好的胶体稳定性。而在柠檬酸盐磷酸盐条件2和3下的流体动力学尺寸趋势类似于贝伐珠单抗匹配条件(条件1),可逆聚集体和共价二聚体形成趋势(在实施例3中所述的在18个月的持续时间中长期储存和加速温度储存稳定性)指示它提供更好的防止聚集的保护。

[0225] 表17. 通过DLS为不同的制剂条件测得的流体动力学尺寸(平均)和扩散系数(平均)。

制剂	条件 1		条件 2		条件 3		条件 4		条件 5	
	靶稀释 蛋白浓度 (mg/mL)	平均流体动力学 尺寸(nm)	平均流体动力学 尺寸(nm)	平均扩散系数 (nm)	平均流体动力学 尺寸(nm)	平均扩散系数 (nm)	平均流体动力学 尺寸(nm)	平均扩散系数 (nm)	平均流体动力学 尺寸(nm)	平均扩散系数 (nm)
1.0	5.6	4.31E-07	5.7	4.30E-07	5.6	4.24E-07	7.6	3.29E-07	6.1	2.51E-07
2.0	6.1	3.94E-07	6.4	3.80E-07	6.3	3.83E-07	6.2	3.87E-07	7.5	3.22E-07
5.0	6.7	3.59E-07	6.9	3.51E-07	6.7	3.60E-07	6.0	4.04E-07	6.3	3.82E-07
10.0	7.2	3.39E-07	7.2	3.31E-07	7.0	3.33E-07	5.8	4.20E-07	5.9	4.13E-07
15.0	7.3	3.27E-07	7.4	3.25E-07	7.4	3.21E-07	5.5	4.44E-07	5.5	4.42E-07
20.0	7.6	3.33E-07	7.9	3.06E-07	7.9	3.05E-07	5.1	4.76E-07	5.3	4.60E-07
25.7	8.0	3.02E-07	8.5	2.81E-07	8.7	2.85E-07	5.1	4.92E-07	5.2	4.73E-07

注：在这里以粗体指示的流体动力学尺寸 (Rh) 是多模态测量结果。

[0226] 固有荧光光谱法指示，所有制剂条件都给贝伐珠单抗提供与匹配组合物 (条件1) 相似的构象稳定性 (表18和图4)。该试验的关键生物物理学描述信息 (最大吸光度和最大波长) 对于所有制剂条件是相似的。

[0227] 表18. 指示最大平均峰和吸光度的所有制剂条件的固有荧光波谱

制剂条件	制剂描述	色氨酸- 295/310	
		平均最大峰(nm)	平均吸光度
<b>1</b>	贝伐珠单抗匹配	<b>341</b>	<b>542.6</b>
<b>2</b>	贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐 pH 5.8	<b>338</b>	<b>502.7</b>
<b>3</b>	贝伐珠单抗柠檬酸盐磷酸盐 pH 6.0	<b>336</b>	<b>522.3</b>
<b>4</b>	贝伐珠单抗乙酸盐 pH 5.6	<b>337</b>	<b>518.5</b>
<b>5</b>	贝伐珠单抗乙酸盐 pH 5.8	<b>336</b>	<b>557.6</b>

[0228] 已经证实了贝伐珠单抗对pH的甚至细微变化具有显著的敏感性，从而导致在过程中间体或在药用物质中存在的聚集体的数量增加 (如果不控制的话)。抗体ONS-5010代表贝伐珠单抗的生物类似物，并且超滤/渗滤过程已得到改善以增强储存稳定性。ONS-5010的最终制剂的指定pH范围是5.9-6.3。在ONS-5010开发过程中已经观察到，接近6.2和更高的pH值会造成%HMWS的继续增加。此外，贝伐珠单抗表现出“可逆聚集”的额外现象。在规定的储存条件 (2-8℃) 下随着时间的推移，在药用物质中存在的总%HMWS物质的一部分将朝聚集状态前进，直到达到平衡为止。这引起了关于药用物质或产物在储存后的储存期限的额外关注。因此，ONS-5010的制造工艺的开发主要围绕理解和始终保持可接受的%HMWS的量来设计。以下实施例详细说明了在下游制造过程中最终单元操作的开发；超滤/渗滤 (UF/DF) 之后是配制和最终过滤。

[0229] 实施例5：常规UF/DF

进行了一系列实验以确定最有效的处理方法。进行了最初的一组实验以确定其中将ONS-5010浓缩并渗滤到最终制剂缓冲液 (FFB) 中的常规UF/DF过程是否可行。条件如表19所示。

[0230] 表19. 常规TFF过程的过程变量和分析结果

	参数	条件(N=3)
条件	膜类型	再生纤维素, PES
	膜截止值	30 kD
	质量负载(g/m <sup>2</sup> )	100 - 150
	渗滤缓冲液	FFB, FFB + 0.02%(v/v) PS-20
	渗透体积	≥5
	负载材料的 NaCl 浓度(mM)	118 - 237
程序	渗滤时的 ONS-5010 浓度(g/L)	12 - 30
操作参数 (渗滤)	TMP	14 - 16
	进料通量(LMH)	240 - 720
	错流速度(LMH)	198 - 645

[0231] 表20: 常规TFF过程的分析结果

中间体	运行1	运行2	运行3
负载材料	2.34	1.05	1.14
BDS	5.73	5.29	4.68
Δ %HMWS	+ 3.39	+ 4.24	+ 3.54

[0232] 在渗滤过程中观察到了大多数HMWS的增加(图6和表20)。在此步骤中,将最初处于具有5.0的pH和25 mS/cm的电导率的乙酸盐溶液中的物质交换进最终制剂缓冲液,其具有6.1的pH和约3.7 mS/cm的电导率。

#### [0233] pH和电导率对聚集的影响

使用表21中的操作条件进行了一项实验以研究pH和电导率的影响。将起始原料浓缩至大约30 g/L,并使用0.5 M磷酸钠(pH 8.0)将等分试样滴定至6.1的最终pH(图7)。这会增加pH,而对电导率具有可忽略的影响,从而导致大约2.2%的HMWS增加。将剩余的浓缩物渗滤到6% (m/v) 海藻糖水溶液中,从而导致电导率从25 mS/cm降低到大约1 mS/cm,而pH没有明显变化。聚集体水平保持不变(图8;数据点1和2),从而证实当渗滤期间电导率变化且pH保持恒定时, HMWS不会受到影响。将从UF/DF步骤在6% (w/v) 海藻糖中回收的物质随后如下稀释至最终蛋白浓度和磷酸盐含量:使用在6% (w/v) α, α' 海藻糖和FFB(不含PS-20)中的0.5 M磷酸钠以靶向25 g/L的近似蛋白浓度和51 mM的磷酸盐摩尔浓度。在这些添加过程中, HMWS增加了1.64% (图8),这与在等分试样去除后浓缩物的pH调整期间观察到的HMWS增加相关(图7)。加入聚山梨酯-20以达到0.04% (v/v) 的最终浓度,并且不会导致聚集的增加。最后,使用真空过滤单元对BDS进行0.2μm过滤,这造成0.50%的聚集额外增加。该实验证实,在UF/DF步骤中大多数HMWS增加的根本原因是由于物质的pH的变化。

[0234] 表21. 在α, α' 海藻糖中的渗滤的过程变量和分析结果

	参数	在 $\alpha, \alpha'$ 海藻糖实验中的渗滤
	批号	<b>B140101/03-D14</b>
条件	膜类型	<b>PES, 30 kD</b>
	质量负载(g/m <sup>2</sup> )	<b>150</b>
	渗滤缓冲液	<b>6%(w/v)<math>\alpha, \alpha'</math>海藻糖水溶液</b>
	渗透体积	<b>5.3</b>
	负载材料	纯净
操作参数 (渗滤)	TMP (psi)	<b>15</b>
	进料通量(LMH)	<b>576</b>
	错流速度(LMH)	<b>530</b>

[0235] 表22: 在 $\alpha, \alpha'$  海藻糖中的渗滤的SEC-HPLC结果

中间体	在 $\alpha, \alpha'$ 海藻糖中的渗滤
起始材料	1.57
预过滤的BDS	3.02
BDS	3.14
$\Delta$ %HMWS	1.95

[0236] 实施例6: 两个渗滤步骤

设计了具有两个渗滤步骤的实验,以确定立即pH变化是否会证实比在常规UF/DF过程中见到的逐渐增加更可靠。试验了三种条件(表22)。首先,在2个渗透体积的6%(w/v) $\alpha, \alpha'$ -海藻糖水溶液后施加磷酸盐掺入(spike),然后是5个渗透体积的FFB,无PS-20。这允许立即pH变化(通过掺入),但是进一步渗滤导致可靠的、可再现的pH和磷酸盐浓度。在第二种条件下,在42 mM磷酸二氢钠、2 mM磷酸氢二钠、6%(w/v) $\alpha, \alpha'$ -海藻糖(pH 5.5)中进行第二个渗滤步骤。回收后,将剩余的磷酸氢二钠掺入以将pH调节至目标值。最后,试验了一种条件,其中在2个渗透体积的6%(w/v) $\alpha, \alpha'$ -海藻糖水溶液之后是5个渗透体积的FFB。结果显示在表23中。

[0237] 表23. 过程变量:2个渗滤步骤

参数	条件 1	条件 2	条件 3
程序	在 2DV 的 6% $\alpha,\alpha'$ -海藻糖以后调节, 随后是 5DV 的 FFB	2DV 的 6% $\alpha,\alpha'$ -海藻糖+回收以后 5DV 的磷酸氢二钠调节	2DV 的 6% $\alpha,\alpha'$ -海藻糖, 随后是 5DV 的 FFB
运行数目	1	1	2
条件			
膜	PES		
表面积(m <sup>2</sup> )	0.02		0.3
质量负载(g/m <sup>2</sup> )	200	200	200
缓冲液#1	6%(w/v) $\alpha,\alpha'$ -海藻糖水溶液		
渗透体积	2.7	2.1	2.3 - 2.4
缓冲液#2	不含 PS-20 的 FFB	42 mM 磷酸二氢钠, 2 mM 磷酸氢二钠, 6%(w/v) $\alpha,\alpha'$ -海藻糖	不含 PS-20 的 FFB
渗透体积	5.1	5.2	5.0 - 5.4
调节溶液	0.51 M 磷酸钠 pH 5.74	固体磷酸氢二钠	N/A
渗滤操作参数			
TMP	15		
进料通量(LMH)	240		

[0238] 表24. SEC-HPLC结果: 2个渗滤步骤

中间体	条件 1		条件 2	条件 3
负载	0.82		1.17	1.17
BDS	2.58	2.60	3.18	2.86
$\Delta\%$ HMWS	1.76	1.78	2.01	1.69

[0239] 所有三种条件导致%HMWS的显著增加, 尽管低于在常规UF/DF实验中, 但表明在磷酸钠中进行的任何渗滤都会导致%HMWS的增加。基于该实验的结果, 所有其它实验都使用6% (w/v)  $\alpha,\alpha'$ -海藻糖水溶液进行渗滤, 并在回收后添加磷酸盐和聚山梨酯-20以将渗余物调节进BDS制剂 (5.8 g/L磷酸二氢钠一水合物, 1.2 g/L无水磷酸氢二钠, 60 g/L $\alpha,\alpha'$ -海藻糖, 0.04%聚山梨酯20, pH 6.1) 中。

[0240] 实施例7: 最终pH对BDS中HMWS水平的影响

为了确认最终pH对BDS中HMWS水平的影响, 进行了一项实验, 其中在6% $\alpha,\alpha'$ -海藻糖水溶液中进行渗滤, 并将回收的渗余物调节至pH 5.5、5.7、5.9和6.1。使用磷酸钠(0.5 M, pH 9)、2M HEPES (pH 9) 和1N NaOH调节pH, 以观察溶液是否对%HMWS有影响, 或者pH是否是%HMWS的唯一的驱动因素(图9)。

[0241] 在图9中的结果证实,BDS的pH对%HMWS有实质性影响,随着pH增加,%HMWS也更高。溶液组分似乎对%HMWS没有影响,进一步的证据表明pH是%HMWS增加的主要驱动因素。

[0242] 实施例8:在pH调节过程中的蛋白浓度对%HMWS的影响

进行一个实验以确定在pH调节过程中的蛋白浓度是否对%HMWS有影响。在6% $\alpha$ , $\alpha$ -海藻糖水溶液中进行渗滤。回收后,将渗余物使用6% $\alpha$ , $\alpha$ -海藻糖水溶液稀释至25、28或30 g/L。然后将25 g/L和30 g/L部分分成三个等分试样,并调节磷酸盐。将28 g/L部分分成四个等分试样;三个都进行了正常的磷酸盐调节,但是第四个通过添加磷酸二氢钠和磷酸氢二钠粉末达到51 mM的最终磷酸钠浓度,pH 6.0。

[0243] 图10中的结果表明,当回收的ONS-5010渗余物的浓度在30 - 25 g/L之间变化时,对%HMWS没有影响。28 g/L浓度的结果另外指示,磷酸盐掺入的组合物似乎并未影响%HMWS的水平。

[0244] 实施例9: 最终的UF/DF过程

使用在表27中概述的参数和在图11中概述的过程,进行了三轮运行以确认在0.02 m<sup>2</sup>模型规模的更新过程。通过方程式1-4添加磷酸钠和聚山梨酯组分。表26显示了来自三个运行的结果。来自确认运行的结果是肯定的。最终溶液含有5.83 g/L磷酸二氢钠和1.22 g/L磷酸氢二钠。在所有运行中的最终磷酸盐浓度为51 mM,且在所有运行中的最终聚山梨酯-20浓度为0.04%v/v。在所有情况下的%HMWS都高于以前的研究,这是由于测量可逆和不可逆聚集体的测定方法中的变化。pH、电导率、浓度和%HMWS在三个运行中都非常一致,表明UF/DF过程是可靠的和可再现的。

[0245] 表25. UF/DF的过程参数和BDS的填充

步骤描述	过程参数	目标	范围
膜准备	膜孔径(kDa)	30	
	膜类型	PES	
	平衡体积(L/m <sup>2</sup> )	5	NA
超滤	膜负载(g/m <sup>2</sup> )	NA	≤500
	进料流速(所有操作) (LMH)	375	≤450
	渗余物压强(psi)	5	≤25
	操作 TMP (所有操作) (psig)	15	≤20
	UF 结束浓度(g/L)	35	30 - 40
渗滤	溶液	6%(w/v) $\alpha, \alpha'$ -海藻糖水溶液	
	渗滤体积	5	≥5
浓缩-除极化	再循环-P <sub>F</sub> (psig)	NA	≤30
	再循环-时间(min)	10	≤60
	缓冲液冲洗-P <sub>F</sub> (psig)	NA	≤30
	缓冲液冲洗-时间(min)	10	≤60
	调节前蛋白浓度(g/L)	35	30 - 40
	活塞流追赶体积(mL)	计算以达到 30±1.5 g/L 的蛋白浓度	
磷酸钠和聚山梨酯 20 添加	调节后蛋白浓度(g/L)	25	22.5 - 27.5
	最终的渗透物/渗余物 pH	6.2	5.9 - 6.3
	最终的渗透物/渗余物电导率(mS/cm)	3.5	3.5±1
过滤和最终填充	浓缩后深度过滤器	MCE/硼硅玻璃 <sup>a</sup>	
	浓缩后深度过滤器容量(L/m <sup>2</sup> )	25	≤25
	最终过滤膜材料	PVDF	
	最终过滤膜(L/m <sup>2</sup> )	50	≤50
	通量(LMH)	300	≤300
BDS 的保留时间	短期储存	在 5±3°C 储存≤60 天	
	长期储存	在制备日期起 60 天内必须在 -20±5°C 储存	
预期的步骤收率(%)		≥95	≥90

<sup>a</sup>过滤器介质是混合的纤维素酯,具有使用硼硅玻璃的预过滤器。

[0246] 方程式1: 磷酸钠添加的计算

$$V_{0.51M \text{ 磷酸钠储备液}} = \frac{V_i}{9}$$

· $V_i$  = 从UF/DF回收的渗余物的体积

方程式2: 聚山梨酯-20添加的计算

$$V_{10\% \text{ PS-20 储备液}} = \frac{V_{ii}}{249}$$

· $V_{ii}$  = 添加0.51M磷酸钠储备溶液以后回收的渗余物的体积

方程式3: 终体积的确定

$$V_{\text{最终}} = \frac{C_{iii} V_{iii}}{25}$$

· $V_{\text{最终}}$  = 达到25g/L的靶蛋白浓度所需的总体积(L)。

[0247] · $C_{iii}$  = 添加0.51M磷酸钠和聚山梨酯20储备溶液以后回收的物质的浓度(g/L)。

[0248] · $V_{iii}$  = 添加0.51M磷酸钠和聚山梨酯20储备溶液以后且在即将稀释之前回收的物质的体积(L)。

[0249] 方程式4. 蛋白浓度稀释剂添加的计算

$$V_{FFB(\text{不含PS-20})} V_{FFB(\text{无PS-20})} = V_{\text{最终}} - V_{iii}$$

· $V_{FFB(\text{含有PS-20})}$  = 将蛋白浓度稀释至25g/L和达到在方程式3中计算的 $V_{\text{最终}}$ 所需的含有0.04%(m/v) PS 20的最终制剂缓冲液的体积(L)。

[0250] · $V_{\text{最终}}$  = 在方程式3中计算的总体积(L)。

[0251] · $V_{iii}$  = 添加0.51M磷酸钠和聚山梨酯20储备溶液以后且在即将稀释之前回收的物质的体积(L)。

[0252] 表26: 来自UF/DF确认运行的结果

属性	规范	运行 1	运行 2	运行 3
pH	5.9 - 6.3 (6.2)	6.0	6.0	6.0
电导率(mS/cm)	N/A	3.98	3.88	3.84
[蛋白] (mg/mL)	23-27.5 (25)	25.2	24.6	24.9
SEC-HPLC 方法	TM-0026 (主要峰)和 TM-0033 (HMWS)			
%主要峰(单体)	≥95	98.5	98.6	98.5
%HMWS	≤5	4.5	4.6	4.7
Met258	≤2	1.3	1.2	1.3

[0253] 表27: UF/DF确认运行的参数

参数	值
膜	PES (Pall Centramate Omega)
表面积 (m <sup>2</sup> )	0.02

质量负载(g/m <sup>2</sup> )	200
渗滤缓冲液	6% (w/v) α, α-海藻糖水溶液
渗透体积	5
进料通量(LMH)	240
TMP (psi)	15

[0254] 在表27中描述的过程被证实是一种可靠的、可再现的过程,尽管膜负载和进料流速低。膜负载是期望的过程时间和渗透通量(随时间变化的渗透物体积)的一个因素。渗透通量受进料速率(LMH)、渗余物压强/跨膜压强和材料粘度影响。为了确定在合理的时间范围内在最小的膜面积中最大量的材料所需的最佳条件,进行了两个优化实验。第一个用于确定通量和流速对产物质量的影响(由%HMWS的增加决定),并且第二个用于确定该过程的可接受的膜负载。

[0255] 实施例10:通量和进料速率对产物质量的影响

在0、5、10、15、20和25 psi的渗余物压强,对于100、200、300、400和500 LMH的进料速率得到了通量速率。选择高于TMP的渗余物压强对照,因为TMP由渗余物压强决定。实验参数示于表28。结果显示在图12-14中。图12显示了在最初的ONS-5010浓度在五个进料流速下初始渗透通量相对于渗余物压强曲线的关系。图13显示了也在最初的ONS-5010浓度在五个进料流速下通量相对于渗余物压强曲线的关系。图14显示了对于浓缩至大约50 g/L的ONS-5010,在五个进料流速下通量相对于渗余物压强曲线的关系。实验指示,在试验的任何条件下,渗透通量没有随着额外的渗余物压强显著增加;因此,将渗余物压强设定在5psi。

[0256] 表28:通量和进料速率实验的影响

参数	值		
膜	PES (Pall Centramate Omega)		
表面积(m <sup>2</sup> )	0.1		
质量负载(g/m <sup>2</sup> )	200		
最初浓度(g/L)	2.3 g/L		
终浓度(g/L)	50 g/L		
渗滤缓冲液	6%(w/v)α,α-海藻糖水溶液		
渗透体积	5		
流速(LMH)	300	375	450
渗余物压强(psi)	5		

[0257] 实施例11:浓度对渗滤过程的影响

渗滤(DF)的最佳浓度通常是允许最小体积和最大渗透通量的浓度。通过将浓度乘以渗透通量来确定DF优化参数。获得的最大数量是执行UF/DF的最佳浓度。图15证实,在试验的范围内,浓度不影响渗透通量,即DF优化因子持续增加。因此,维持在35 g/L的渗滤先前目标。这与磷酸盐添加过程相结合,形成了可靠的且可再现的UF/DF过程。

## [0258] 实施例12:可接受的膜负载的确定

将500 g/m<sup>2</sup>的膜负载鉴定为目标,并进行以下实验以多种流速评价它。将这些相对于对照条件进行了试验。按照过程A.0,将5DV UFDF和系统冲洗后的材料样品掺入51mM磷酸盐和0.04%吐温20中,并在SEC-HPLC分析之前进行注射器式过滤(表30)。如表30所示,HMWS的变化并没有随着进料流速的增加而增加,并且所有三个运行关于HMWS与对照运行(运行4)相当。

## [0259] 表29:可接受的膜负载的确定

参数	运行 1	运行 2	运行 3	对照
膜	PES (Pall Centramate Omega)			
表面积(m <sup>2</sup> )	0.02			
质量负载(g/m <sup>2</sup> )	500			200
渗滤缓冲液	6%(w/v) $\alpha,\alpha$ -海藻糖水溶液			
渗透体积	5			
流速(LMH)	300	375	450	240
渗余物压强(psi)	5			N/A
TMP (psi)	N/A			15

## [0260] 表30: 来自可接受的膜负载的确定的结果

属性	HMWS			HMWS		LMWS	
	开始	BDS	$\Delta$	开始	BDS	开始	BDS
运行 1	2.2	6.0	3.8	97.7	93.9	0.05	0.05
运行 2	2.3	6.1	3.8	97.7	93.9	0.05	0.04
运行 3	2.7	6.1	3.4	97.3	93.9	0.05	0.04
运行 4	2.7	6.4	3.7	97.2	93.5	0.06	0.05

## [0261] 实施例13: 在ONS-5010和阿伐他汀制剂之间的比较研究

将ONS-5010的效能与替代贝伐珠单抗制剂(包括配制用于美国和配制用于欧洲的阿伐他汀)进行了对比。图16显示了ONS-5010、美国许可的阿伐他汀和欧洲许可的阿伐他汀的平均值的浓度-时间概况。在时间零点的垂直线表示给药。这些结果证明了这三种产品之间的高度相似性。

## 序列表

- <110> Outlook Therapeutics, Inc.  
 <120> 用贝伐珠单抗的缓冲制剂治疗疾病的方法  
 <130> ONBI-013/001W0 325849-2089  
 <150> US 62/776,686  
 <151> 2018-12-07  
 <150> US 62/658,772  
 <151> 2018-04-17  
 <160> 4  
 <170> PatentIn 3.5版  
 <210> 1  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 贝伐珠单抗重链IgG1  
 <400> 1

[0001]

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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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 Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

[0002]

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 贝伐珠单抗轻链

<400> 2

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

[0003]

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Thr Val Pro Trp  
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

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 贝伐珠单抗重链可变区

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

[0004]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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 Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 贝伐珠单抗轻链可变区

&lt;400&gt; 4

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45

[0005]

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

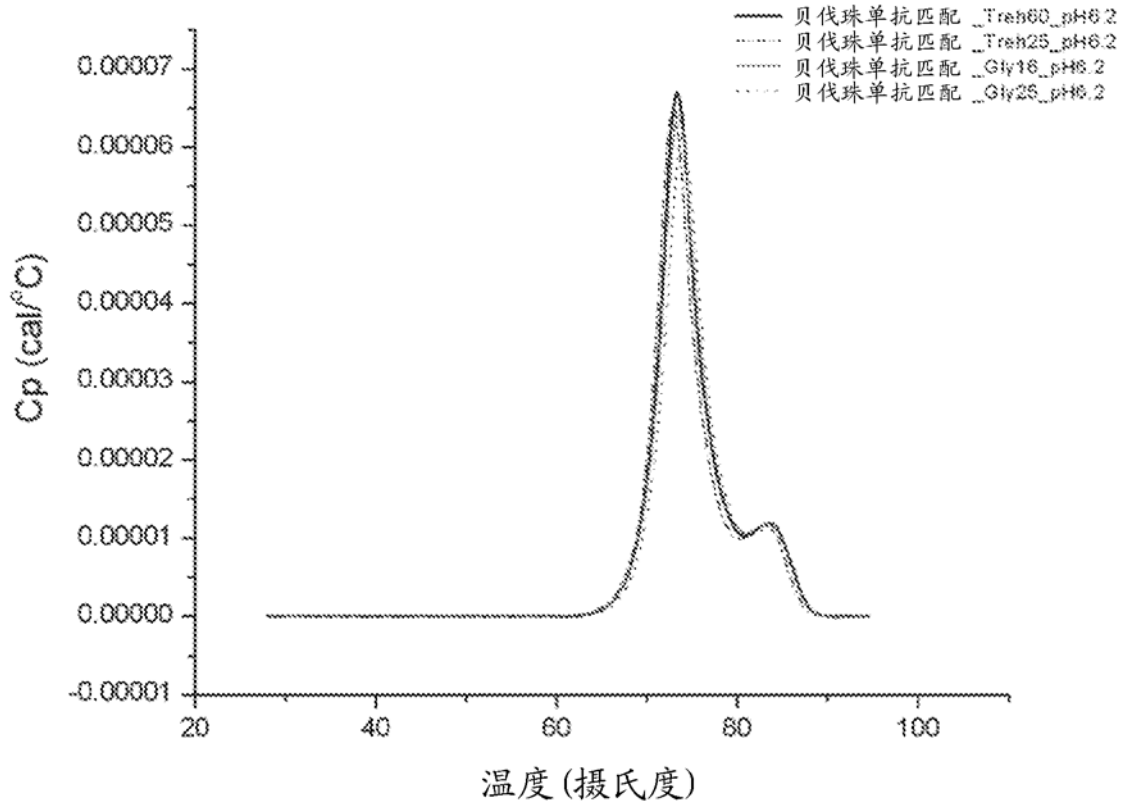


图 1

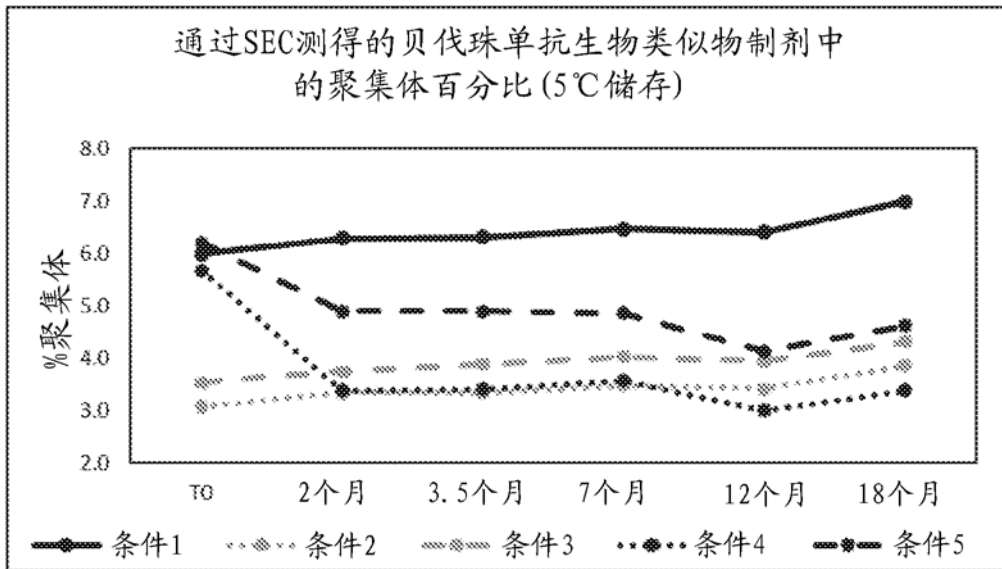


图 2A

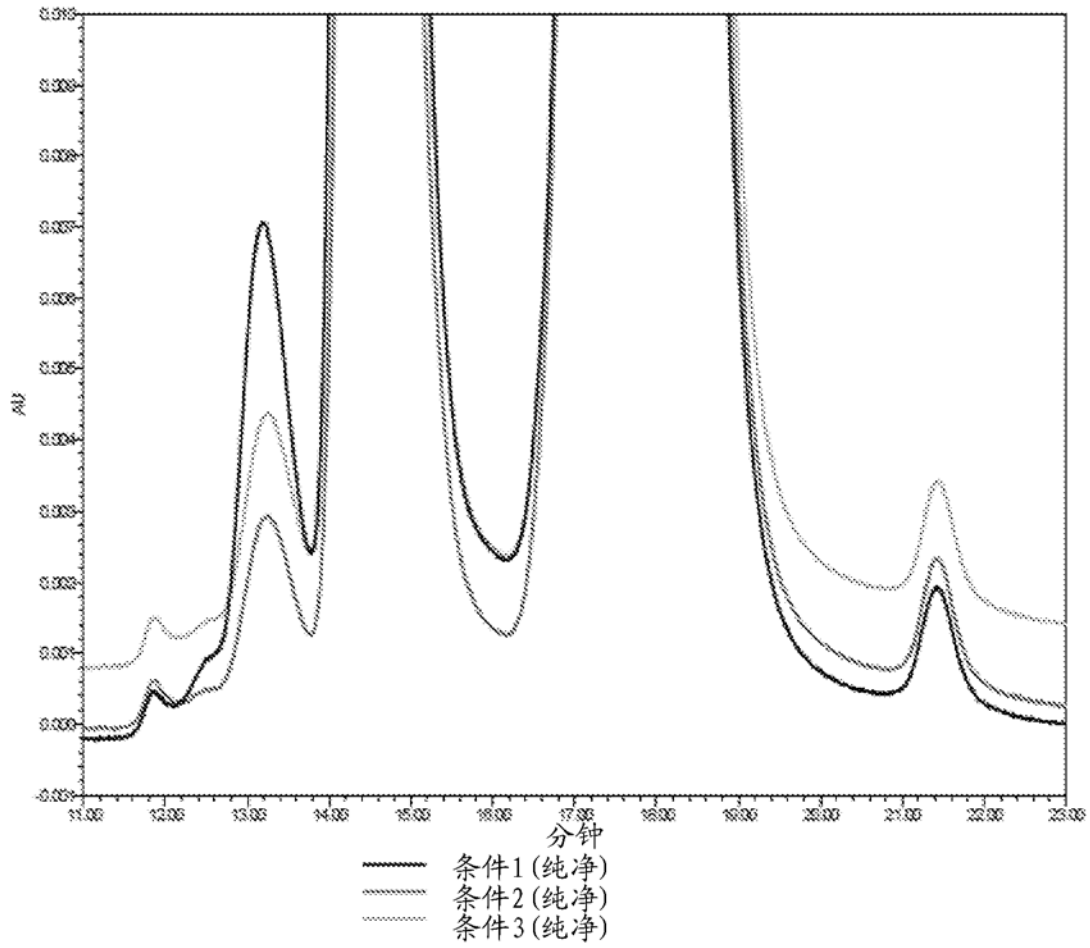


图 2A (i)

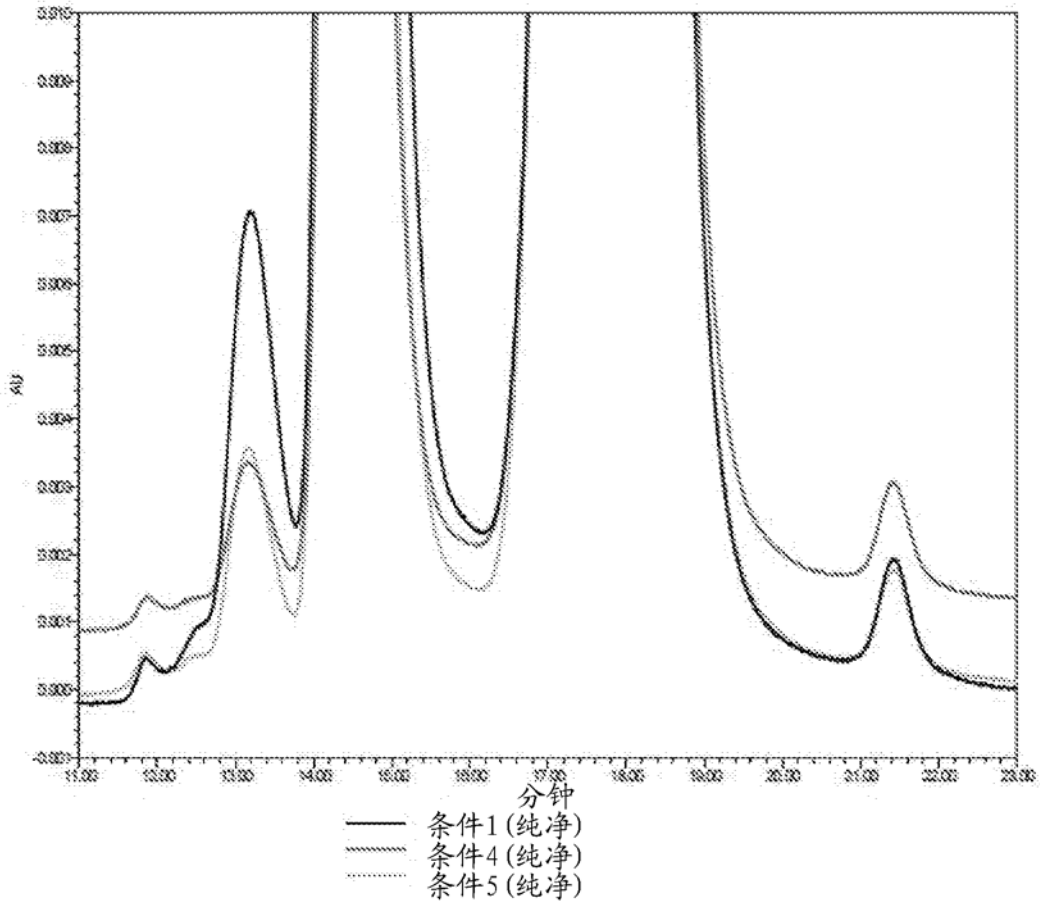


图 2A(ii)

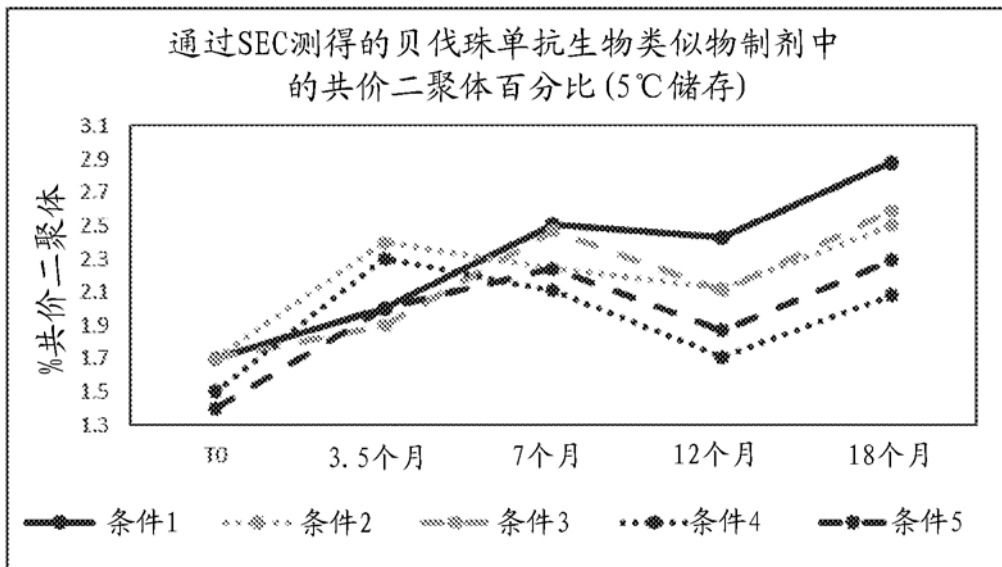


图 2B

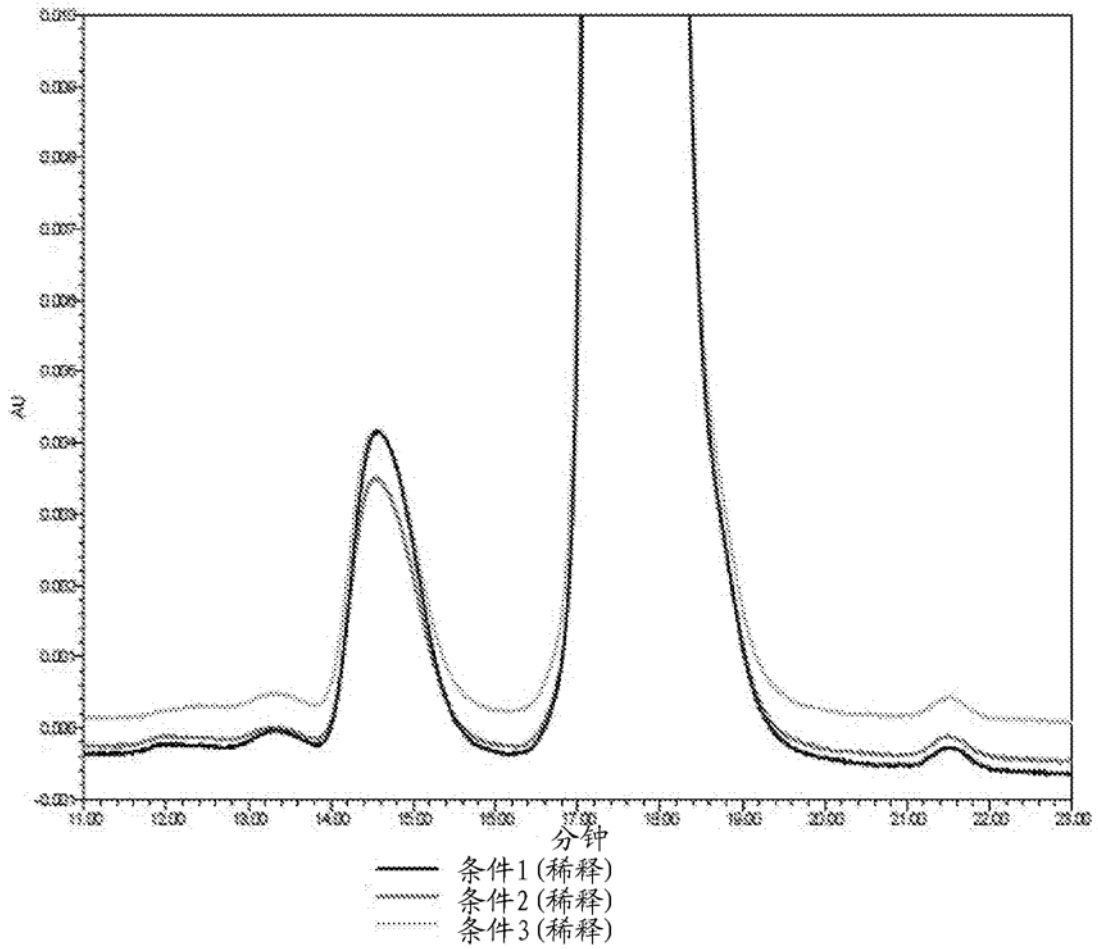


图 2B(i)

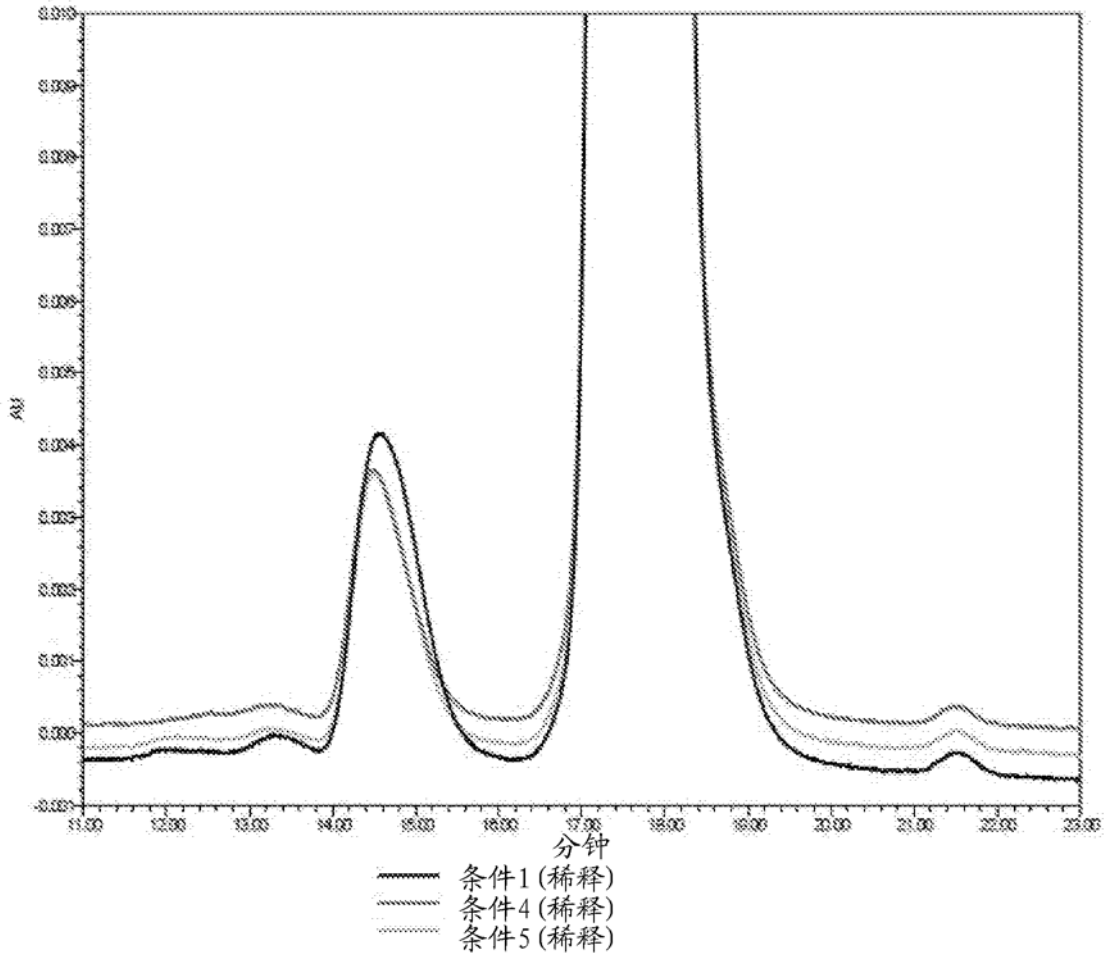


图 2B(i)

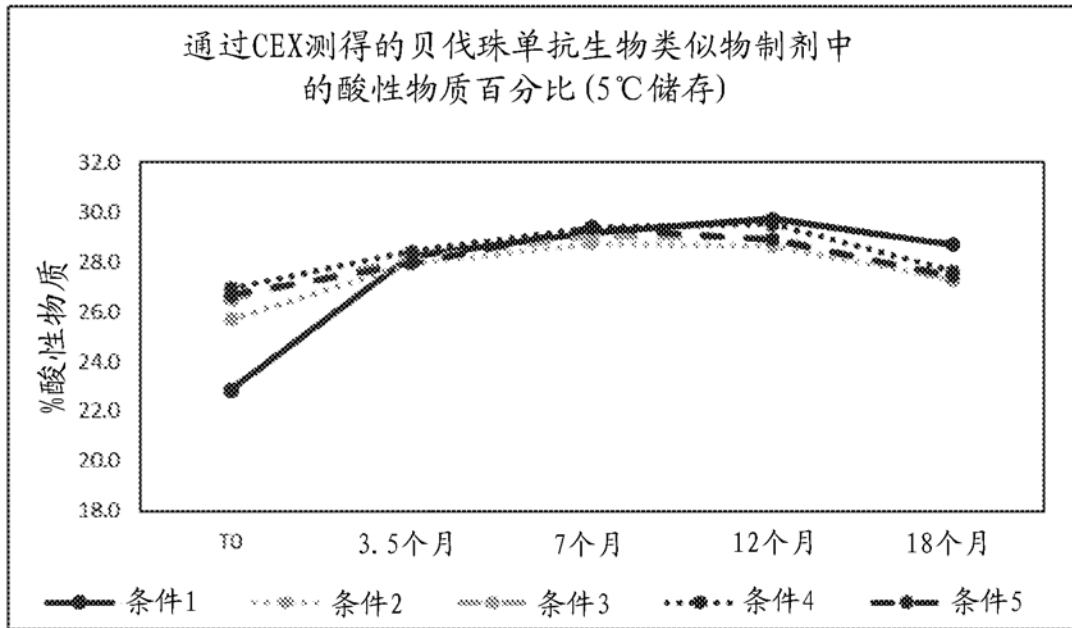


图 2B(iii)

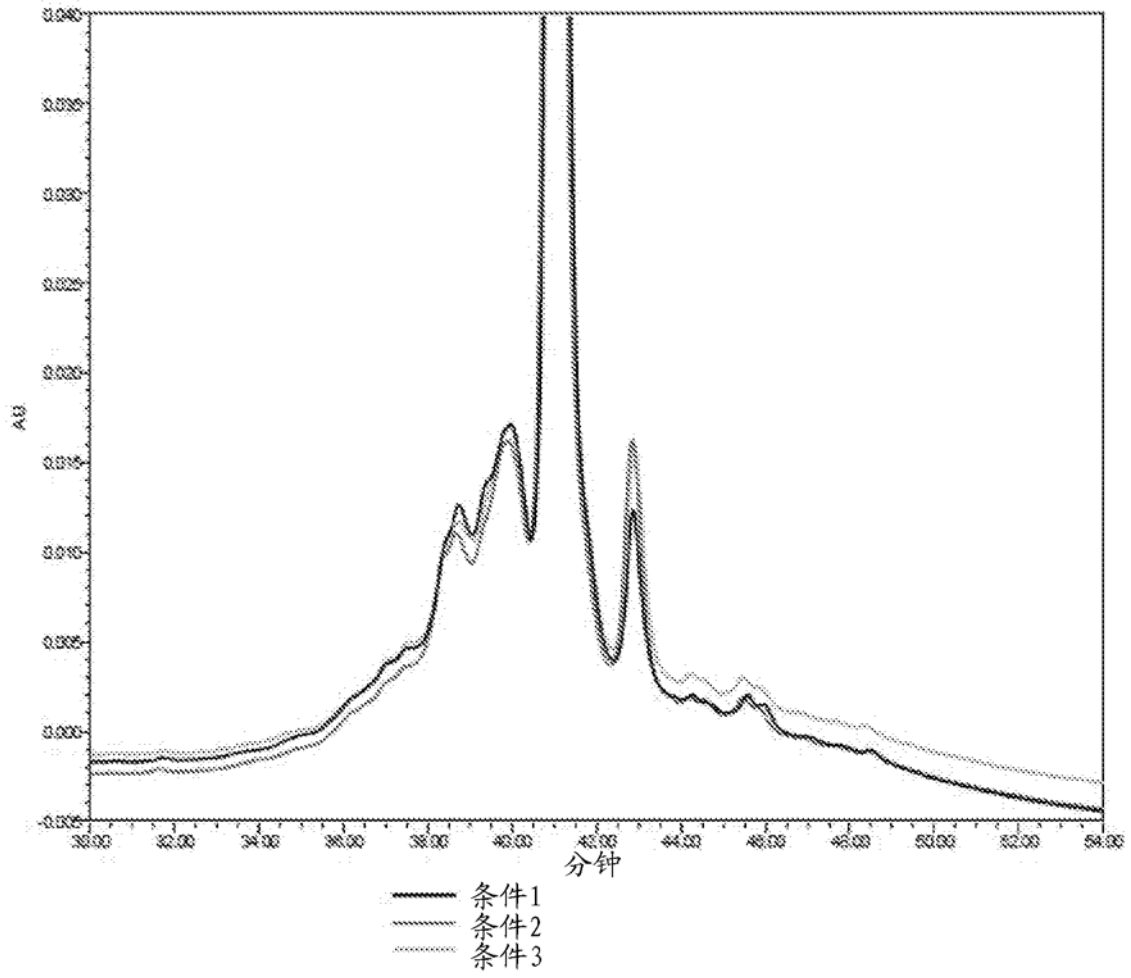


图 2B(iv)

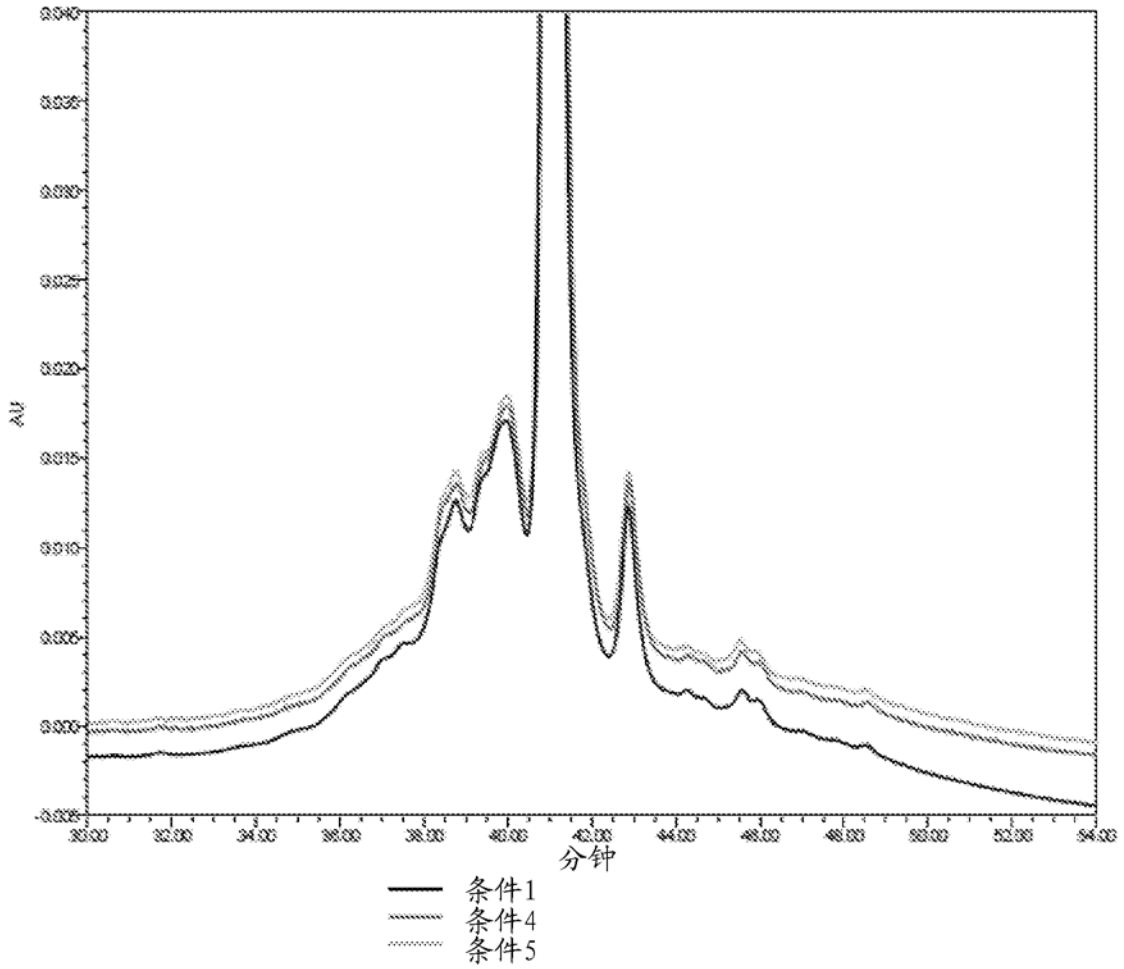


图 2B(v)

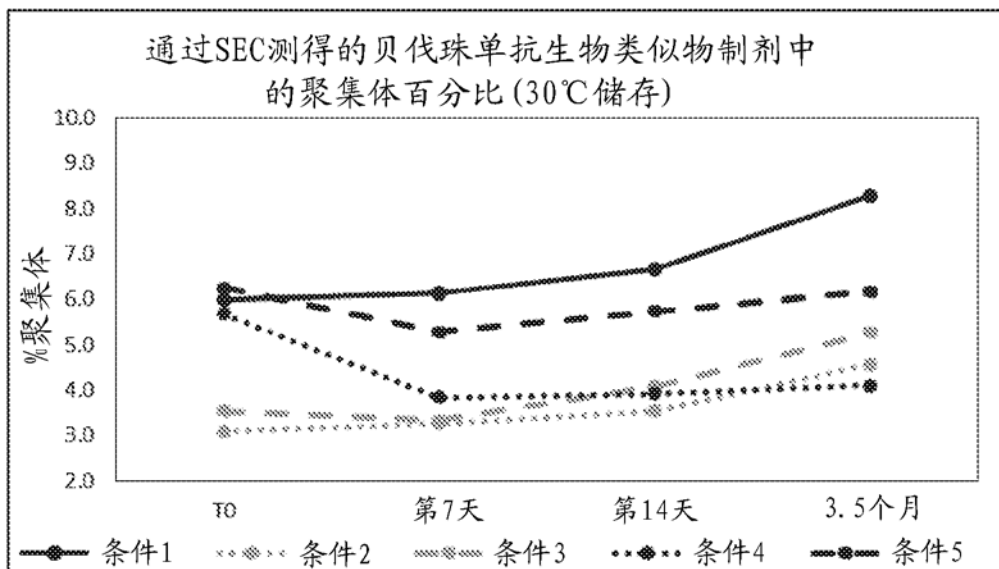


图 2C

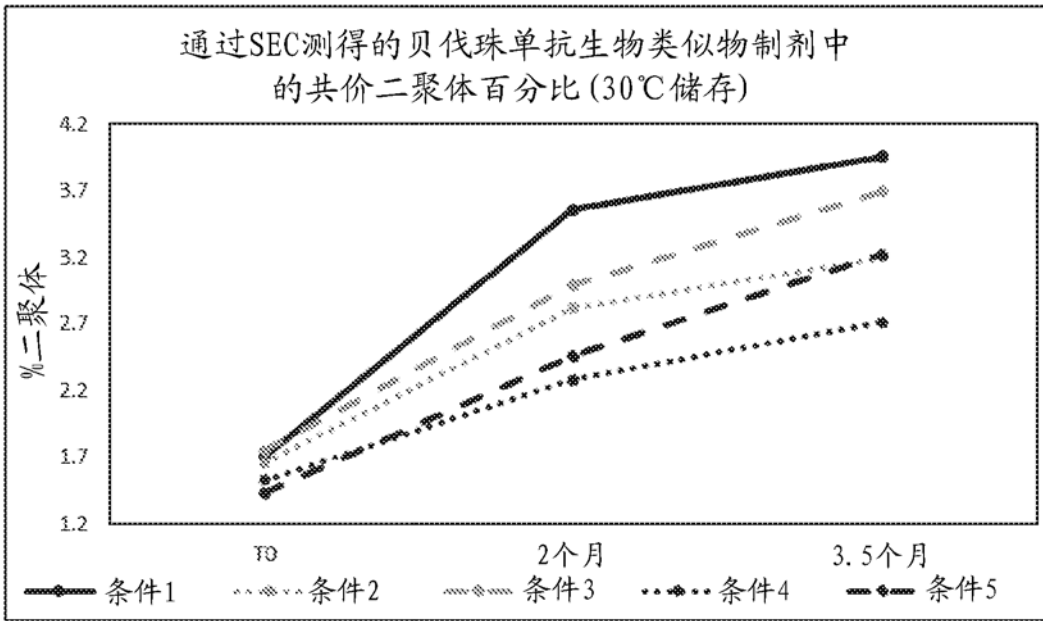


图 2D

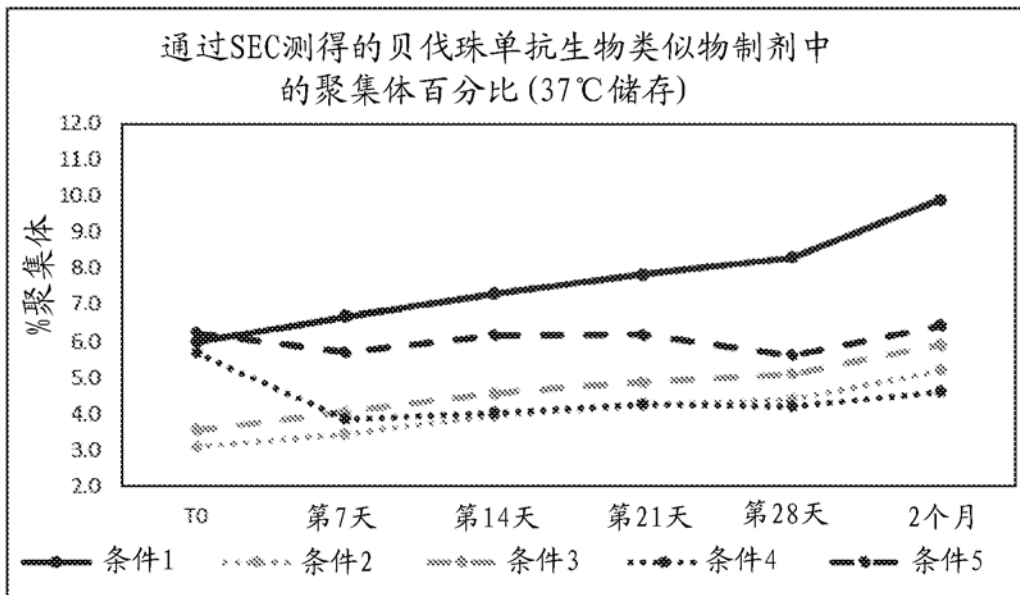


图 2E

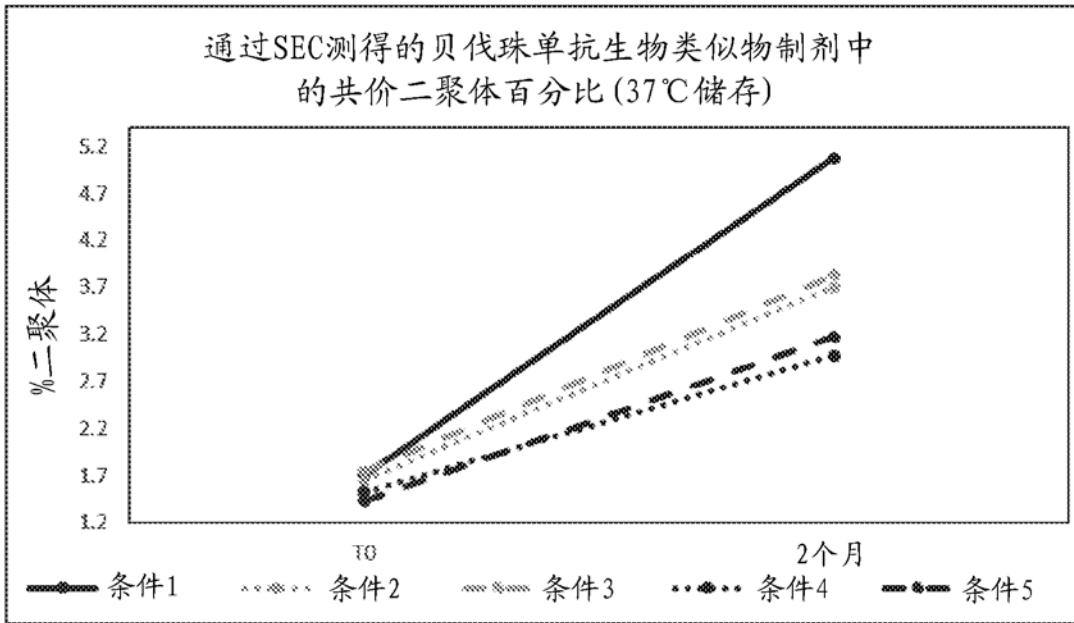


图 2F

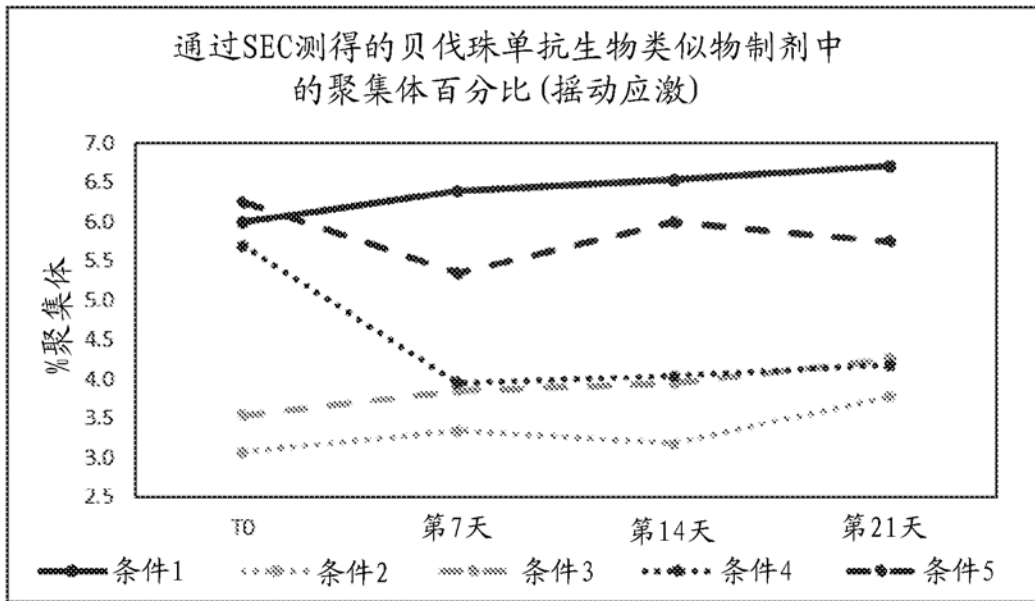


图 2G

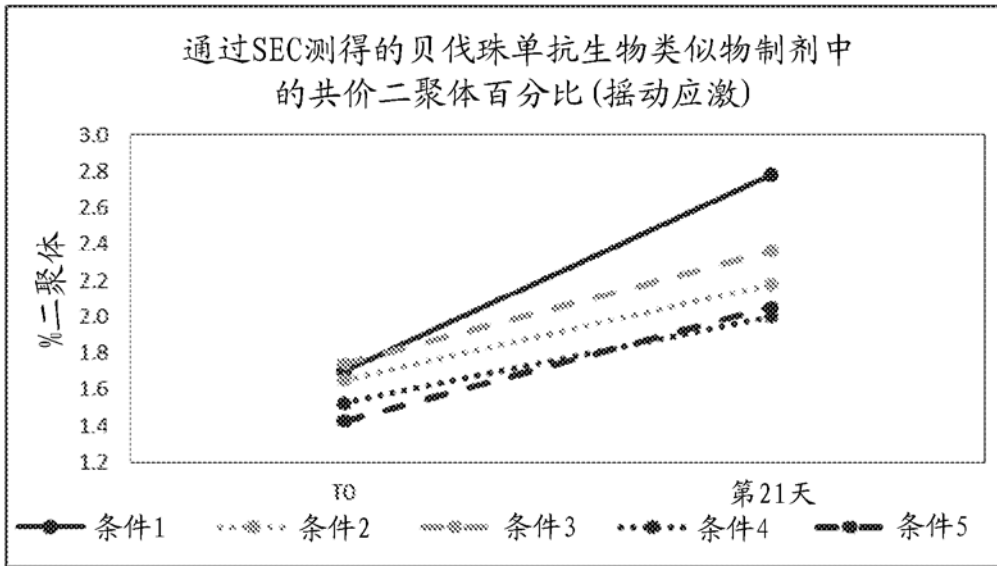


图 2H

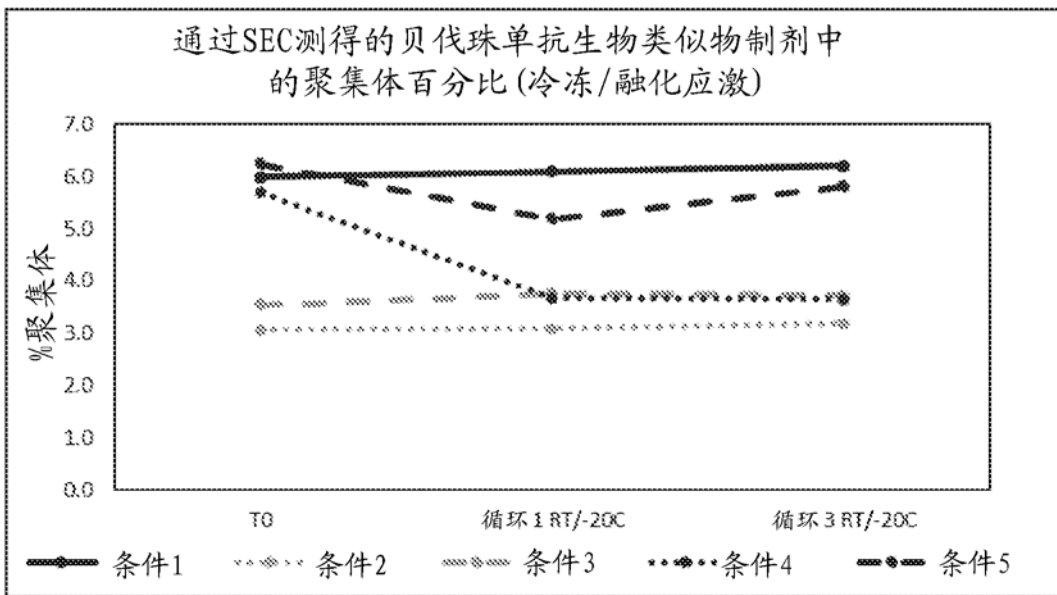


图 2I

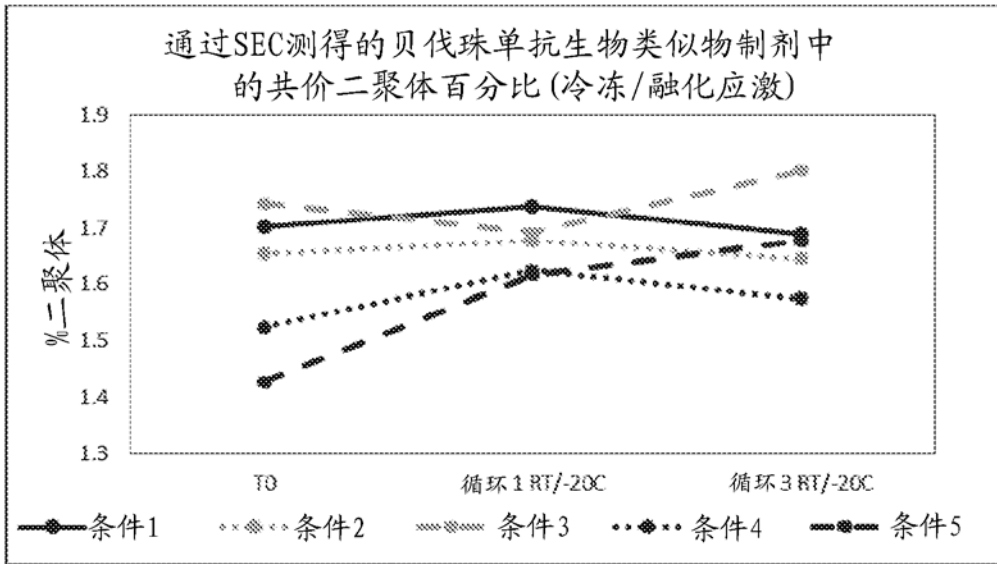


图 2J

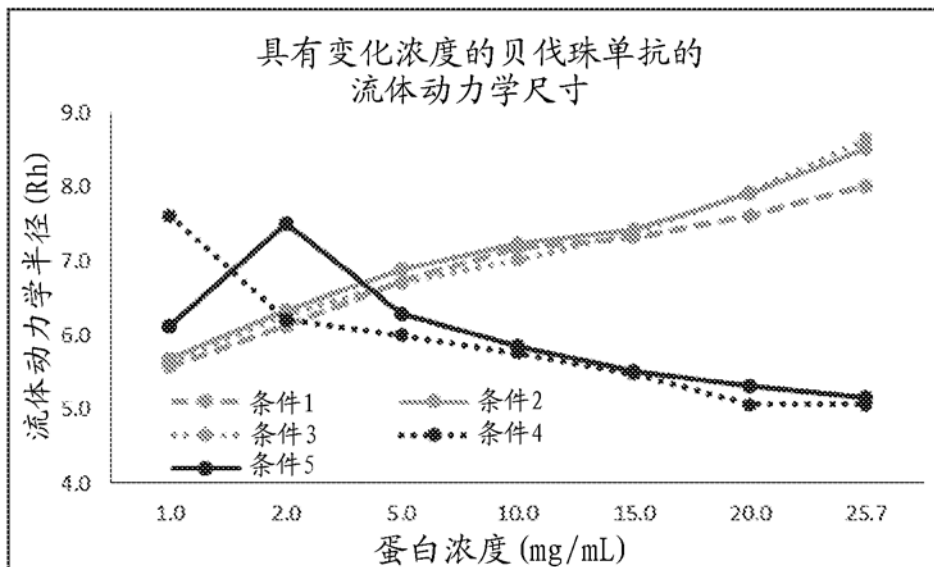


图 3

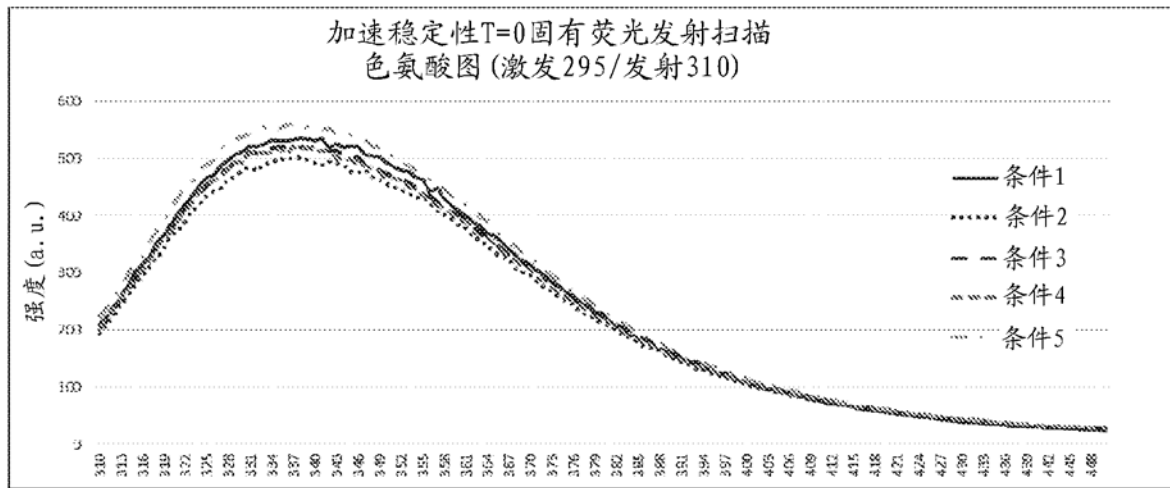


图 4

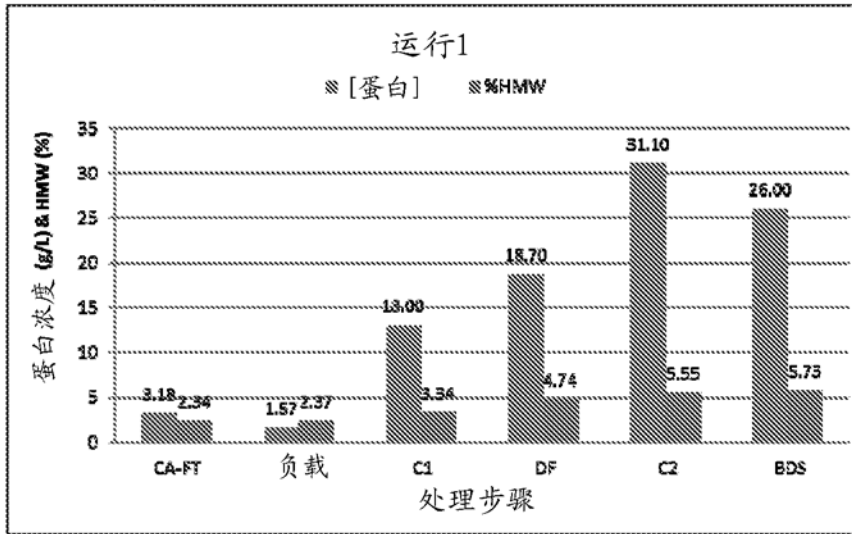
ONS-5010制造工艺的工艺流程简图



图 5

用于切向流过滤的UF/DF中的中间物质的蛋白浓度和% HMWS

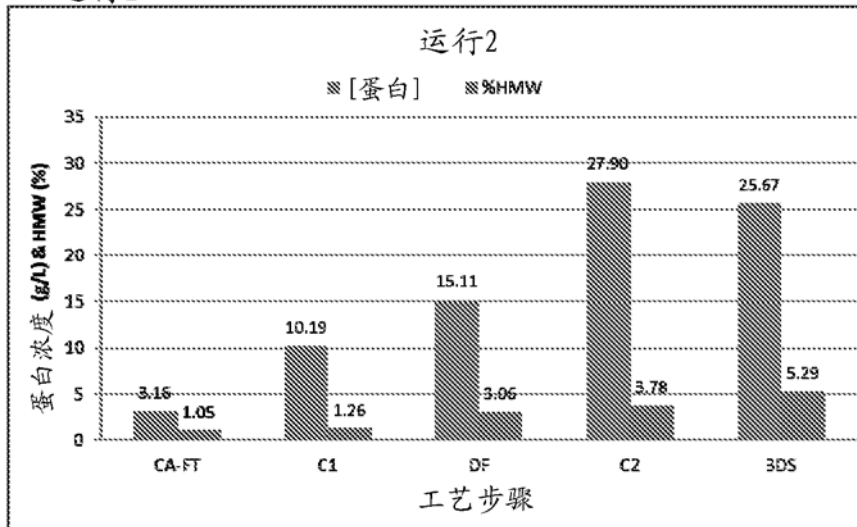
A. 运行1



图例: CA-FT—负载; Load—稀释的负载; C1—初次浓缩后; DF—渗滤后; C2—最终浓缩后; BDS—最终过滤后

图 6A

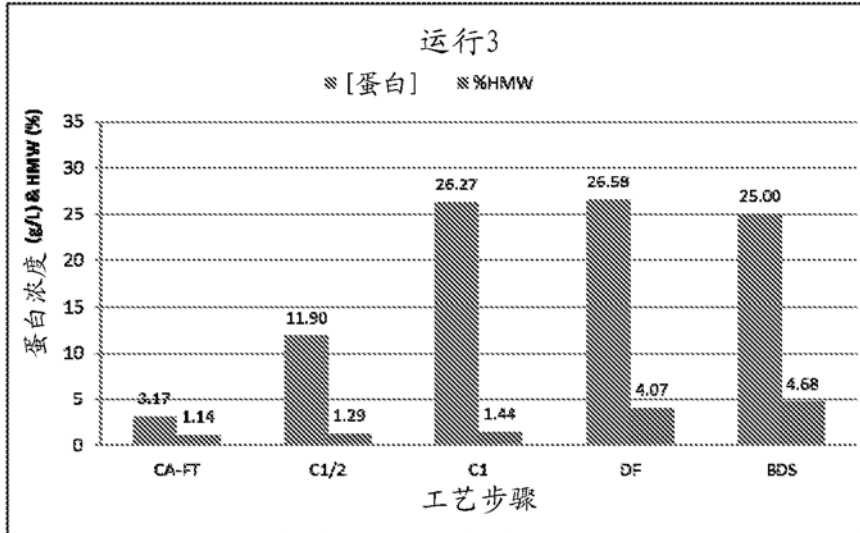
B. 运行2



图例: CA-FT—负载; C1—初次浓缩后; DF—渗滤后; C2—最终浓缩后; BDS—最终过滤后

图 6B

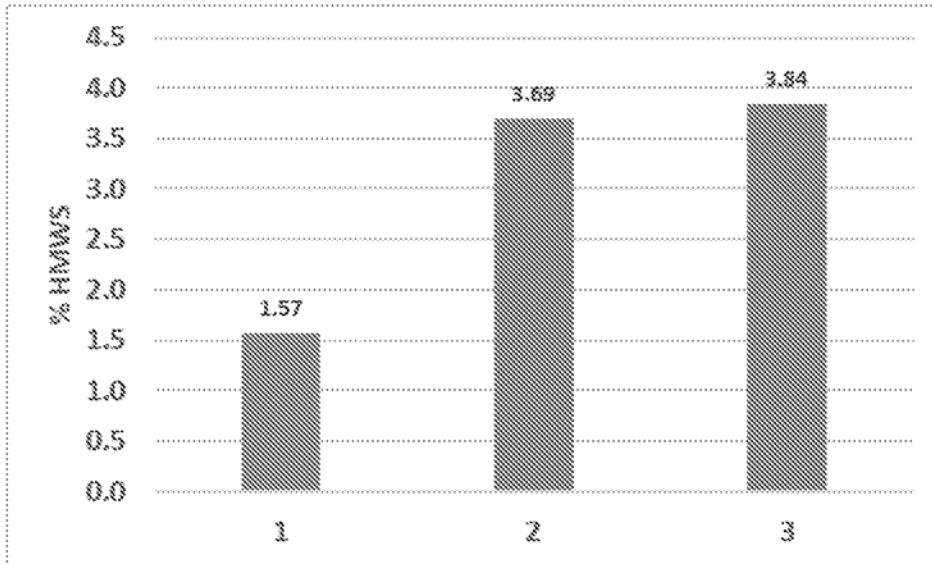
C.运行3



图例: CA-FT—负载; C1/2—浓缩至目标的1/2后; C1—浓缩后; DF—渗滤后; BDS—最终过滤后

图 6C

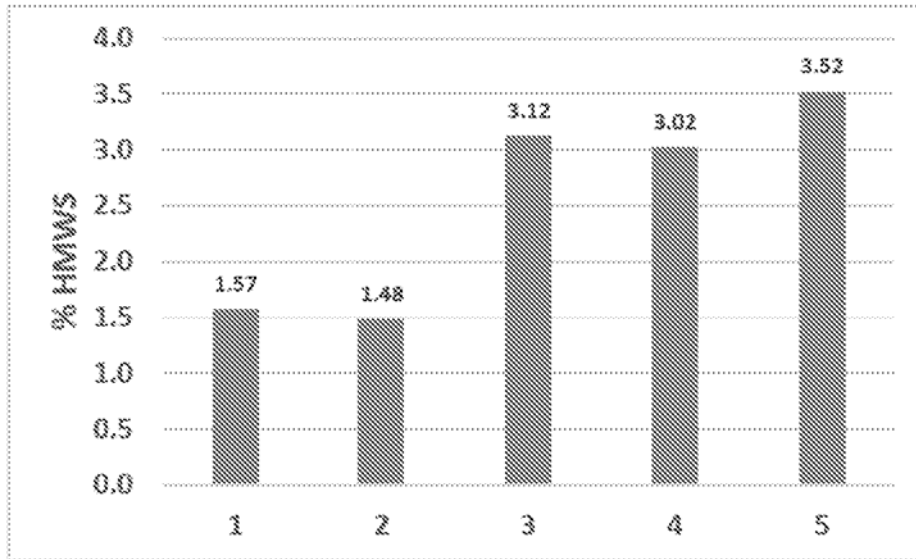
滴定的物质的SEC-HPLC结果



图例: 1-负载物质; 2-pH调节后; 3-过滤后

图 7

在6% (w/v)  $\alpha, \alpha'$  海藻糖水溶液中渗滤、随后添加磷酸盐的SEC-HPLC结果



图例: 1-负载物质; 2-渗滤后; 3-通过磷酸盐添加进行pH调节和通过FFB添加进行浓度调节后; 4-PS-20添加后; 5-0.2um过滤后 (BDS)

图 8

pH对BDS中的%HMWS的影响

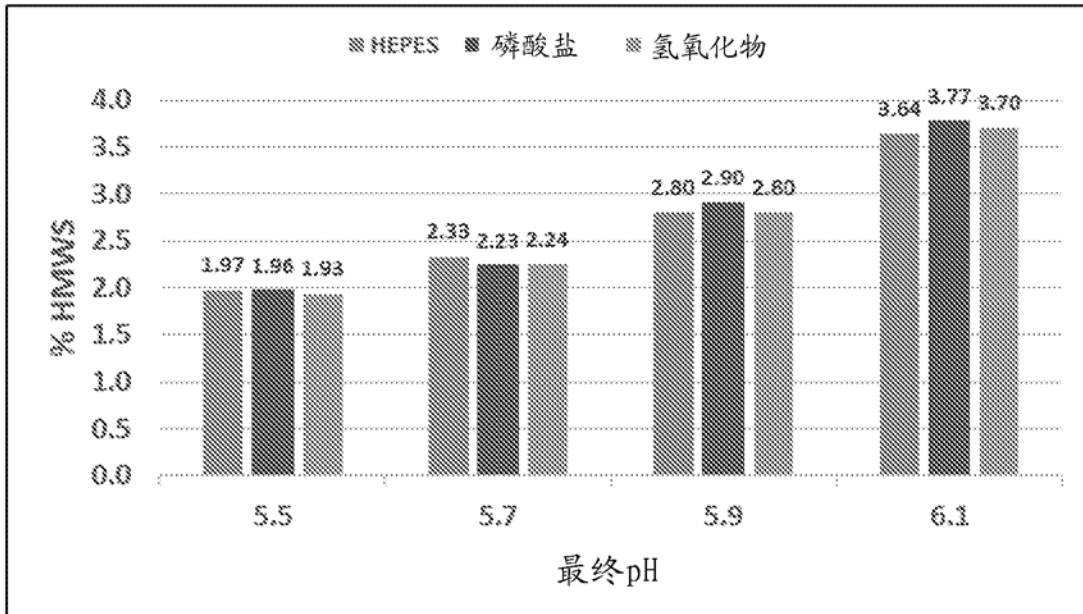
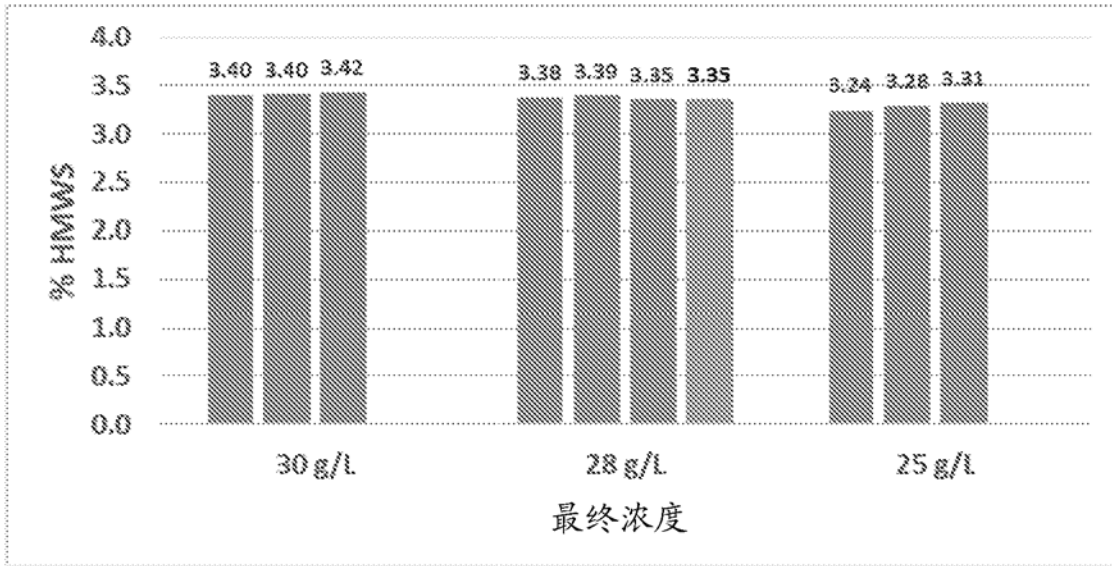


图 9

在pH调节时的浓度对%HMWS<sup>1</sup>的影响



<sup>1</sup>灰色条代表这样的等分试样: 其中用固体磷酸二氢钠和磷酸氢二钠而不是储备溶液进行磷酸盐调节。

图 10

用于最终UF/DF单元操作的工艺流程图

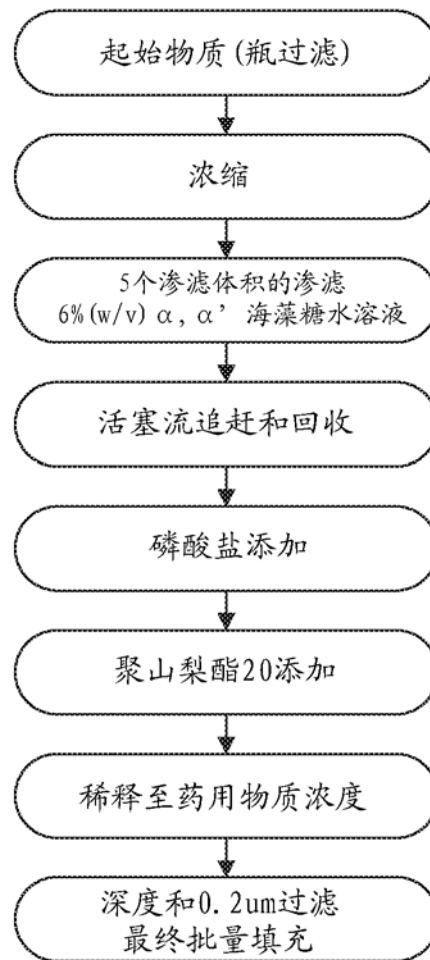


图 11

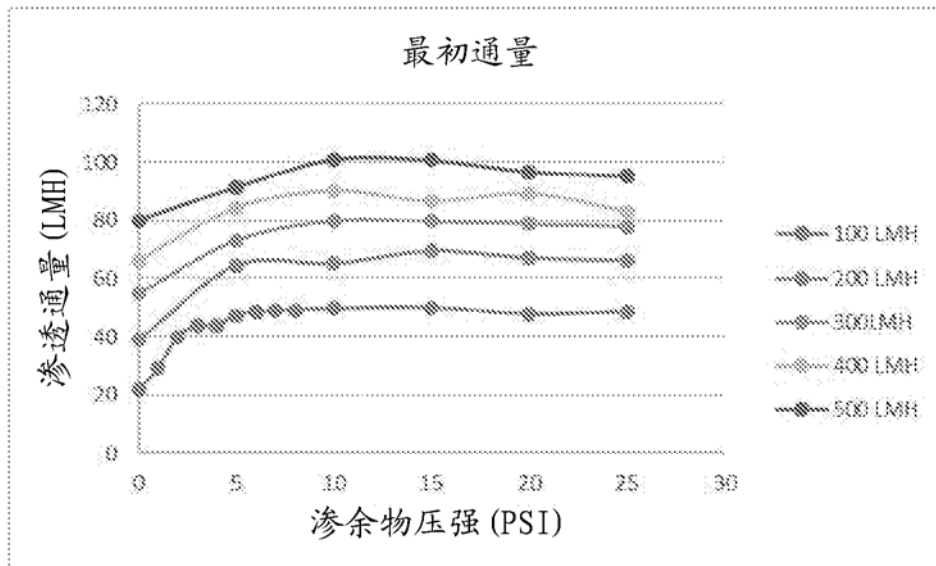


图 12

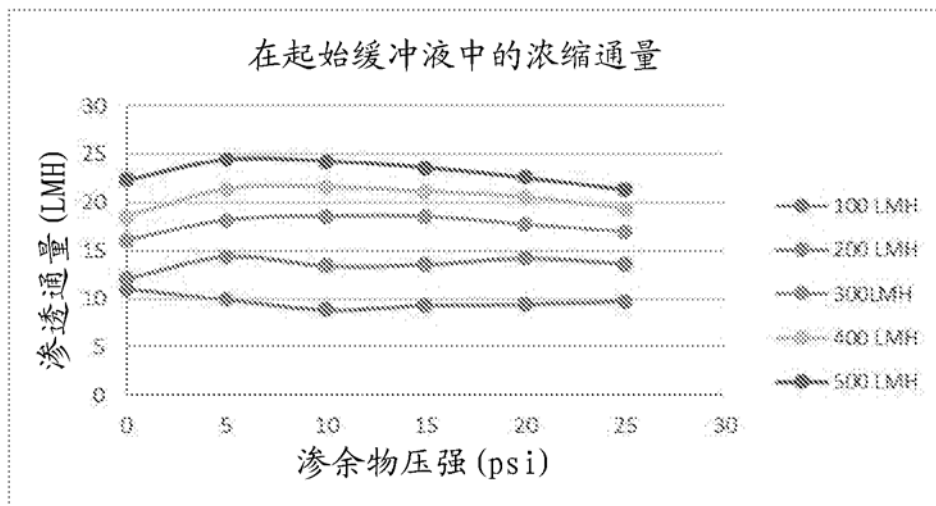


图 13

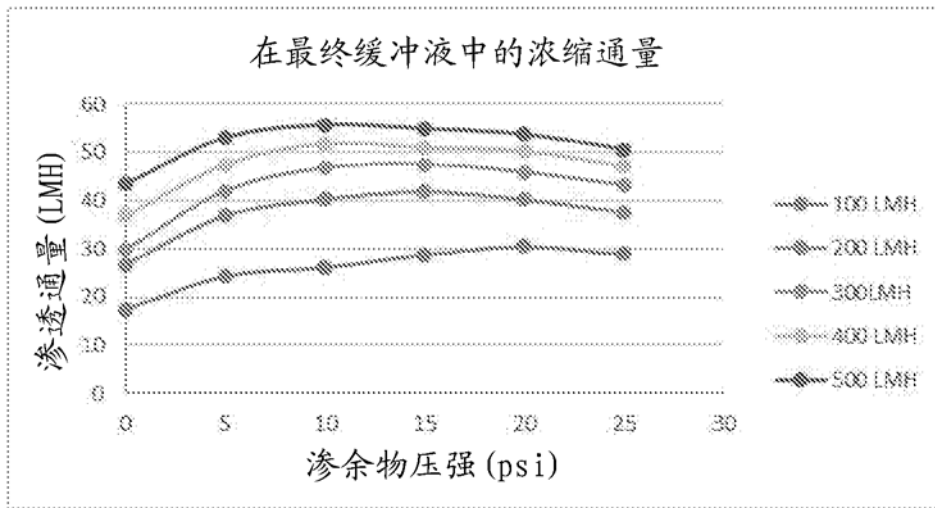


图 14

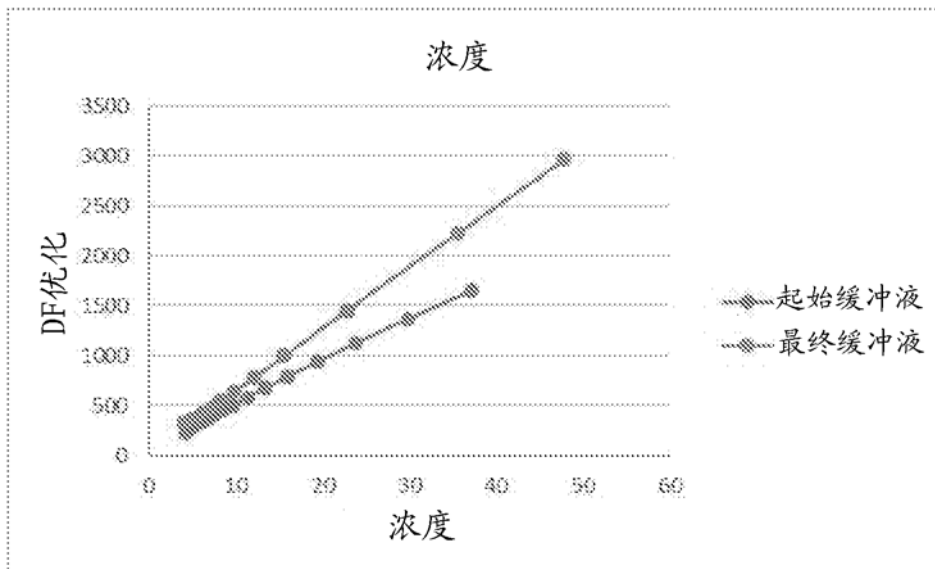


图 15

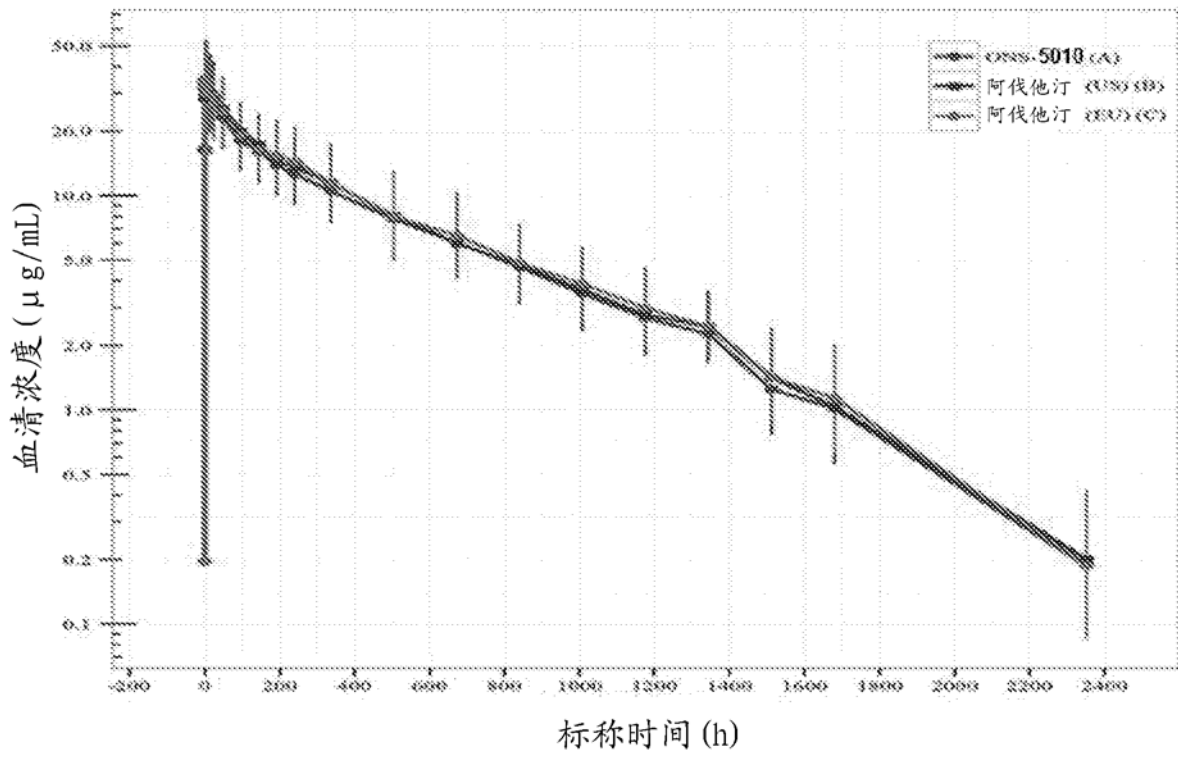


图 16