



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108883175 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201780016205.0

(22)申请日 2017.03.09

(30)优先权数据

1604124.6 2016.03.10 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/055594 2017.03.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/153541 EN 2017.09.14

(71)申请人 UCB生物制药私人有限公司

地址 比利时布鲁塞尔

(72)发明人 A·J·耶茨 J·G·克利普斯通

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

C07K 16/22(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

A61K 47/40(2006.01)

权利要求书2页 说明书26页 附图3页

(54)发明名称

药物制剂

(57)摘要

本发明涉及包含抗体或其抗原结合片段、环糊精和甲硫氨酸的液体药物制剂。另外,其涉及通过添加甲硫氨酸和环糊精来减少液体药物制剂中抗体或其抗原结合片段的沉淀的方法。具体地,液体药物制剂包含抗硬骨素抗体、羟基丙基- γ 环糊精和甲硫氨酸,并且可以用于治疗与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关的骨病症,尤其适用于治疗骨质疏松症。此外,本发明还涉及减轻哺乳动物受试者的注射部位处的炎症的方法,其包括施用治疗有效量的包含抗体或其抗原结合片段、环糊精和甲硫氨酸的液体药物制剂。

1. 一种液体药物制剂,其包括:
 - a. 抗体或其抗原结合片段作为活性成分;
 - b. 环糊精和
 - c. 甲硫氨酸。
2. 权利要求1的液体制剂,其包含浓度为7.5mM至200mM的甲硫氨酸。
3. 权利要求1或2的液体制剂,其包含浓度为7.5mM至250mM的环糊精。
4. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其包含浓度为1至200mg/ml,优选90至180mg/ml的抗体或其抗原结合片段。
5. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人硬骨素。
6. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其中所述抗体是人或人源化抗体或其抗原结合片段。
7. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其中:
 - a. 所述抗体或其抗原结合片段
 - i. 包含具有SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1;具有SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2;具有SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3;具有SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1;具有SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3;或
 - ii. 具有拥有SEQ ID NO:7中定义的序列的轻链可变区和拥有SEQ ID NO:8中定义的序列的重链可变区;或
 - b. 所述抗体,其具有:
 - i. 具有SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中定义的序列的重链;或
 - ii. 具有SEQ ID NO:11中所定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:12中定义的序列的重链。
8. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其中所述抗体是罗莫索单抗。
9. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其具有为4.0至7.5的pH。
10. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其中所述环糊精选自 α -环糊精、 β -环糊精、二甲基- β -环糊精、三甲基- β -环糊精、随机甲基化的 β -环糊精、羟基乙基- β -环糊精、羟基丙基- β -环糊精(即2-羟基丙基- β -环糊精、3-羟基丙基- β -环糊精或2,3-二羟基丙基- β -环糊精)、羟基异丁基- β -环糊精、磺基丁醚- β -环糊精、葡萄糖基- β -环糊精、麦芽糖基- β -环糊精、 γ -环糊精、羟基丙基- γ -环糊精(即2-羟基丙基- γ -环糊精、3-羟基丙基- γ -环糊精或2,3-二羟基丙基- γ -环糊精)、含环糊精的聚合物或其组合。
11. 权利要求10的液体制剂,其中所述环糊精选自羟基丙基- γ -环糊精。
12. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其中所述制剂包含1mg/ml至200mg/ml的抗体、10mM至55mM的醋酸钠、0至14mM的醋酸钙、0至6%的蔗糖、0至0.006%的聚山梨醇酯20、55mM至80mM的羟基丙基- γ -环糊精、55mM至160mM的甲硫氨酸,pH 5.2。
13. 权利要求12的液体制剂,其中所述制剂包含90mg/ml至180mg/ml,优选120mg/ml至180mg/ml的罗莫索单抗。

14. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其中所述液体制剂不是水凝胶。

15. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其中所述液体制剂包含至少2%,至少5%,至少10%,至少25%,2%至90%,2%至75%,或2%至50%的水。

16. 前述权利要求中任一项的液体制剂,其用于治疗与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关的骨病症。

17. 一种用于治疗哺乳动物受试者的与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关的骨病症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的权利要求1-15中任一项的制剂。

18. 权利要求1-15中任一项的液体制剂在制备药剂中的用途,所述药剂用于治疗与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关的骨病症。

19. 根据权利要求16的所使用的液体制剂,根据权利要求18的用途或根据权利要求17的治疗方法,其中所述骨病症是骨质疏松症。

20. 一种用于减少液体药物制剂中抗体或其抗原结合片段的沉淀的方法,所述方法包括提供液体制剂并向所述制剂中加入甲硫氨酸和环糊精,优选羟基丙基- γ -环糊精。

21. 一种减少哺乳动物受试者的注射部位处的炎症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的权利要求1-15中任一项的制剂。

药物制剂

发明领域

[0001] 本发明属于药物制剂领域。更具体地,其涉及包含抗体、环糊精和甲硫氨酸的药物制剂。

[0002] 发明背景

[0003] 抗体是大而复杂的分子,并且当以高浓度储存一段时间时固有地呈现化学和物理不稳定性。典型的化学不稳定性可导致脱酰胺、水解、氧化、 β -消除或二硫键交换。物理不稳定性可导致变性、聚集或沉淀。

[0004] 抗体可被配制成冷冻干燥的,即冻干形式,用于在施用前不久在溶剂中重建。冷冻干燥的抗体制剂往往比液体水基制剂更稳定,因为水是反应物或促进反应物的转移,因此对化学降解和蛋白质不稳定性至关重要。尽管不太稳定,但最近人们开始关注抗体的液体制剂。与冷冻干燥的制剂相比,这些制剂可被患者和保健专业人员更容易和更方便地处理和施用。液体制剂不需要重建,并且可用最少的制备而施用。然而,在液体制剂中稳定蛋白质以避免或最小化聚集、沉淀或降解仍然具有特别的挑战性。随着不溶性物质或沉淀物的形成,聚集是一个特别的问题。这可导致各种问题。首先,聚集体形成可导致抗体活性减小或不再具有活性;聚集物可在施用后引起不希望的和意外的免疫反应,最后聚集物可妨碍药物制剂的适当施用,例如,通过阻塞注射器或泵。这些问题在用于皮下施用的液体制剂(其中抗体以高浓度存在于比静脉内输注小得多的体积中)中甚至更加明显。

[0005] 防止聚集的典型策略是向抗体制剂中添加稳定剂。常用的稳定剂包括糖、盐、游离氨基酸、多元醇、聚乙二醇(PEG)和其他聚合物,诸如可以减少蛋白质间相互作用的聚山梨醇酯或泊洛沙姆。

[0006] 环糊精(有时称为环状直链淀粉)是由在环中结合在一起的糖分子(环状低聚糖)组成的化合物家族。环糊精通过酶促转化由淀粉产生。它们被认为是安全的并且广泛用于食品、药物递送和化学工业,以及农业和环境工程。环糊精由5个或更多个1 $\rightarrow$ 4连接的 α -D-吡喃葡萄糖苷单元组成,如在直链淀粉中。典型的环糊精在一个环中含有6个(α -环糊精)、7个(β -环糊精)或8个(γ -环糊精)葡萄糖单体单元,从而形成锥形形状,其中内部是疏水性的并且外部是亲水性的。疏水空腔提供了可将非极性化合物例如非极性氨基酸包含在其中并形成复合物的环境。

[0007] W02010057107描述了使用环糊精(CD)减少生理条件下的聚集。此外,环糊精及其衍生物已被用作水溶性差的药物的增溶剂。在液体制剂中包含环糊精的目前可用的药品包括SporanoxTM(Janssen,Belgium)、保达新(Ono,Japan;Schwarz,Germany)、Prostandin 500(Ono,Japan)、GeodonTM(Pfizer,USA)、VFENDTM(Pfizer,USA)、MitoExtra MitozytrexTM(Novartis,Switzerland)和Voltaren OpthaTM(Novartis,Switzerland)(Szejtli J.,Pure Appl.Chem.76:1825-1845(2004);Loftsson T.等,Expert Opin.Drug Deliv.2,335-351(2005))。这些制剂中的大多数用于小分子化合物。通常在低环糊精浓度下获得最大益处,并且益处通常仅部分地依赖于浓度。例如,0.5%HP- β -环糊精最佳地抑制IL-2的聚集。(Loftsson T.和Brewster M.E.,J Pharm Sci 85:1017-1025(1996))。以约2-6%存在的CD

改善了人生长激素的溶解度,其中发现 α 和 γ 环糊精的效果比 β 环糊精低几倍。(Otzen,D.E.等,Protein Sci.11:1779-1787(2002))。

[0008] 虽然抗体的一级序列确定其pI,并且其本质上负责其在施用时的沉淀倾向(例如pH变换),但制剂组合物将另外地影响该行为并且还影响其他性质,包括粘度和重量摩尔渗透压浓度。制剂中赋形剂与活性成分之间的改变的相互作用可影响其长期稳定性。这对于被开发用于皮下施用的抗体制剂是特别相关的,其中高蛋白质浓度满足较低的给药体积,并且蛋白质聚集和沉淀变得更加明显并且可能是注射副作用的原因。

[0009] 鉴于上述情况,本领域仍需要提供具有减少的蛋白质聚集和沉淀的抗体的进一步改进的液体药物制剂,尤其是用于皮下施用途径的制剂。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明通过提供包含抗体或抗原结合片段作为活性成分的新型液体制剂解决了上述需要。就聚集体(沉淀物)在液体药物制剂中的出现而言,现在在稳定剂之间令人惊讶地观察到协同稳定作用。

[0012] 因此,在第一方面,本发明提供液体药物制剂,其包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)、环糊精和甲硫氨酸。

[0013] 在该方面的第一个实施方案中,液体药物制剂包含浓度为7.5mM至200mM的甲硫氨酸。

[0014] 在第二实施方案中,根据第一个方面和实施方案的液体药物制剂包含浓度为7.5mM至250mM的环糊精。

[0015] 在第三实施方案中,根据第一个方面及其实施方案的液体药物制剂包含浓度为1-200mg/ml,优选90-180mg/ml的抗体或其抗原结合片段。在第四实施方案中,根据第一方面的液体药物制剂及其实施方案包含特异性结合人硬骨素(sclerostin)和/或为人或人源化抗体的抗体或其抗原结合片段。

[0016] 在第五实施方案中,根据第一方面及其实施方案的液体药物制剂包含:

[0017] 1. 抗体或其抗原结合片段,其

[0018] a. 包含具有SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1;具有SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2;具有SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3;具有SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1;具有SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3;或

[0019] b. 具有拥有SEQ ID NO:7中定义的序列的轻链可变区和拥有SEQ ID NO:8中定义的序列的重链可变区;或

[0020] 2. 抗体,其具有:

[0021] a. 具有SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中定义的序列的重链;或

[0022] b. 具有SEQ ID NO:11中所定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:12中定义的序列的重链。

[0023] 在第六实施方案中,根据第一个方面及其实施方案的液体药物制剂包含抗体罗莫索单抗(romosozumab)。

[0024] 在第七实施方案中,根据第一方面及其实施方案的液体制剂具有4.0至7.5的pH。

[0025] 在第八实施方案中,根据第一方面及其实施方案的液体制剂包含选自下述的环糊精: α -环糊精、 β -环糊精、二甲基- β -环糊精、三甲基- β -环糊精、随机甲基化 β -环糊精、羟基乙基- β -环糊精、羟基丙基- β -环糊精(即2-羟基丙基- β -环糊精、3-羟基丙基- β -环糊精或2,3-二羟基丙基- β -环糊精)、羟基异丁基- β -环糊精、磺基丁醚- β -环糊精、葡萄糖基- β -环糊精、麦芽糖基- β -环糊精、 γ -环糊精、羟基丙基- γ -环糊精(即2-羟基丙基- γ -环糊精、3-羟基丙基- γ -环糊精或2,3-二羟基丙基- γ -环糊精)、含环糊精的聚合物或其组合。优选地,环糊精选自羟基丙基- γ -环糊精。

[0026] 在第九实施方案中,根据第一方面及其实施方案的液体制剂包含1mg/ml至200mg/ml的抗体、10mM至55mM的醋酸钠、0至14mM的醋酸钙、0至6%的蔗糖、0至0.006%的聚山梨醇酯20、55mM至80mM的羟基丙基- γ -环糊精、55mM至160mM甲硫氨酸,pH 5.2;优选90mg/ml至180mg/ml,更优选120mg/ml至180mg/ml的罗莫索单抗。

[0027] 在第二方面,本发明提供了根据第一方面及其实施方案的液体制剂,其用于治疗与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关的骨病症。或者,本发明提供了根据第一方面及其实施方案的液体制剂在制备用于治疗骨病症的药剂中的用途,所述骨病症与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关。

[0028] 此外,在第三方面,本发明提供了用于治疗哺乳动物受试者中与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关的骨病症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的根据第一方面及其实施方案的制剂。

[0029] 优选地,在本发明的第二和第三方面的实施方案中,骨病症是骨质疏松症。

[0030] 在第四方面,本发明提供了用于减少液体药物制剂中抗体或其抗原结合片段的沉淀的方法,该方法包括提供液体制剂并向制剂中添加甲硫氨酸和环糊精,优选羟基丙基- γ -环糊精。

[0031] 最后,在第五方面,本发明提供了用于减轻哺乳动物受试者中注射部位处的炎症的方法,其包括施用治疗有效量的根据第一方面及其实施方案的制剂。

[0032] 附图简述

[0033] 图1显示罗莫索单抗轻链的序列(SEQ ID NO:11)。氨基酸序列使用三字母符号表示,每个氨基酸下面有相应的单字母符号。链内二硫键由连接的半胱氨酸之间的线指示。形成链间键的半胱氨酸示于框中。

[0034] 图2显示罗莫索单抗重链的序列(SEQ ID NO:12)。氨基酸序列使用三字母符号表示,每个氨基酸下面有相应的单字母符号。链内二硫键由连接的半胱氨酸之间的线指示。形成链间键的半胱氨酸示于框中。

[0035] 发明详述

[0036] 根据本发明的液体药物制剂包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)和两种稳定剂甲硫氨酸和环糊精的组合。

[0037] 甲硫氨酸和环糊精的协同组合提供了额外的有利方面,即降低随着时间的推移聚集形式的抗体或其抗原结合片段的沉淀速率,从而潜在地减少注射副反应的发生。因此,本发明还提供了用于减少液体药物制剂中抗体或其抗原结合片段的沉淀的方法,该方法包括提供液体制剂并向制剂中加入甲硫氨酸和环糊精。

[0038] 液体药物制剂中环糊精的浓度可以是7.5mM至250mM,或16mM至250mM,或32mM至200mM,或63mM至160mM,或优选55mM至80mM。

[0039] 液体药物制剂中甲硫氨酸的浓度可以是7.5mM至200mM或15mM至200mM或30mM至200mM或55mM至160mM,或优选55mM至125mM。

[0040] 在一个实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)和比例为1:1至1:3,优选1:2的环糊精与甲硫氨酸。

[0041] 在一个优选实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)、55mM至160mM的甲硫氨酸和55mM至100mM的环糊精。

[0042] 具体地,环糊精可选自 α -环糊精、 β -环糊精、二甲基- β -环糊精、三甲基- β -环糊精、随机甲基化的 β -环糊精、羟基乙基- β -环糊精、羟基丙基- β -环糊精(即2-羟基丙基- β -环糊精、3-羟基丙基- β -环糊精或2,3-二羟基丙基- β -环糊精)、羟基异丁基- β -环糊精、磺基丁基醚 β -环糊精、葡萄糖基- β -环糊精、麦芽糖基- β -环糊精、 γ -环糊精、羟基丙基- γ -环糊精(即2-羟基丙基- γ -环糊精、3-羟基丙基- γ -环糊精或2,3-二羟基丙基- γ -环糊精)、含环糊精的聚合物或其组合。

[0043] 最常见的天然环糊精是 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精,它们都是亲水性的。羟基的取代进一步增强了环糊精的溶解度(Loftsson T.等,Expert Opin.Drug Deliv.2, 335-351 (2005);Davis M.E.&Brewster M.E.,Nature Reviews Drug discovery 3,1023-1035 (2004))。

[0044] 化学修饰(即在羟基上取代)的感兴趣的环糊精是单、二或三甲基- β -环糊精、随机甲基化的 β -环糊精、羟基乙基- β -环糊精、羟基丙基- β -环糊精(即2-羟基丙基- β -环糊精、3-羟基丙基- β -环糊精或2,3-二羟基丙基- β -环糊精)、羟基异丁基- β -环糊精、磺基丁基醚 β -环糊精、葡萄糖基- β -环糊精、麦芽糖基- β -环糊精、羟基丙基- γ -环糊精(即2-羟基丙基- γ -环糊精、3-羟基丙基- γ -环糊精或2,3-二羟基丙基- γ -环糊精)或其组合。

[0045] 因此,根据本发明的液体药物制剂包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)以及甲硫氨酸和化学修饰的环糊精的组合,所述环糊精优选选自单、二或三甲基- β -环糊精、随机甲基化的 β -环糊精、羟基乙基- β -环糊精、羟基丙基- β -环糊精(即2-羟基丙基- β -环糊精、3-羟基丙基- β -环糊精或2,3-二羟基丙基- β -环糊精)、羟基异丁基- β -环糊精、磺基丁基醚 β -环糊精、葡萄糖基- β -环糊精、麦芽糖基- β -环糊精、羟基丙基- γ -环糊精(即2-羟基丙基- γ -环糊精、3-羟基丙基- γ -环糊精或2,3-二羟基丙基- γ -环糊精)或其组合。

[0046] 液体药物制剂中化学修饰的环糊精的浓度可以是7.5mM至250mM,或16mM至250mM,或32mM至200mM,或63mM至160mM,或优选55mM至80mM。

[0047] 在一个实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)和比例为1:1至1:3,优选1:2的化学修饰的环糊精与甲硫氨酸。

[0048] 在一个优选的实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)、55mM至160mM的甲硫氨酸和55mM至100mM的化学修饰的环糊精。

[0049] 根据本发明的优选环糊精是羟基丙基- γ -环糊精,例如2-羟基丙基- γ -环糊精、3-羟基丙基- γ -环糊精、2,3-二羟基丙基- γ -环糊精或其组合。

[0050] 因此,在一个优选实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)以及甲硫氨酸和羟基丙基- β -环糊精(即2-羟基丙基- β -环糊精、3-羟基丙基- β -环糊精或2,3-二羟基丙基- β -环糊精)或其组合。

基丙基-β-环糊精、2,3-二羟基丙基-β-环糊精或其组合)的组合。

[0051] 液体药物制剂中羟基丙基-γ-环糊精的浓度可以是7.5mM至250mM,或16mM至250mM,或32mM至200mM,或63mM至160mM,或优选55mM至80mM。

[0052] 在另一个实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)和比例为1:1至1:3,优选1:2的羟基丙基-γ-环糊精与甲硫氨酸。

[0053] 在另一个实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含抗体或其抗原结合片段(作为活性成分)、55mM至160mM的甲硫氨酸和55mM至100mM的羟基丙基-γ-环糊精。

[0054] 根据本发明的液体制剂中抗体或其抗原结合片段的浓度可为1至200mg/ml,或至200mg/ml,或至200mg/ml,或优选90至180mg/ml。在另一个实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含90mg/ml至180mg/ml的抗体(作为活性成分)、55mM至160mM的甲硫氨酸和55mM至100mM的环糊精。

[0055] 具体地,环糊精可选自β-环糊精、二甲基-β-环糊精、三甲基-β-环糊精、随机甲基化的β-环糊精、羟基乙基-β-环糊精、羟基丙基-β-环糊精(即2羟基丙基-β-环糊精、3-羟基丙基-β-环糊精或2,3-二羟基丙基-β-环糊精)、羟基异丁基-β-环糊精磺基丁基醚β-环糊精、葡萄糖基-β-环糊精、麦芽糖基-β-环糊精、γ-环糊精、羟基丙基-γ-环糊精(即2羟基丙基-γ-环糊精、3-羟基丙基-γ-环糊精或2,3-二羟基丙基-γ-环糊精)、含环糊精的聚合物或其组合。

[0056] 在另一个实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含90mg/ml至180mg/ml的抗体(作为活性成分)、55mM至160mM的甲硫氨酸和55mM至100mM的化学修饰的环糊精,所述环糊精优选选自单、二或三甲基-β-环糊精、随机甲基化的β-环糊精、羟基乙基-β-环糊精、羟基丙基-β-环糊精(即2羟基丙基-β-环糊精、3-羟基丙基-β-环糊精或2,3-二羟基丙基-β-环糊精)、羟基异丁基-β-环糊精磺基丁基醚β-环糊精、葡萄糖基-β-环糊精、麦芽糖基-β-环糊精、羟基丙基-γ-环糊精(即2羟基丙基-γ-环糊精、3-羟基丙基-γ-环糊精或2,3-二羟基丙基-γ-环糊精)或其组合。

[0057] 在一个优选实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含90mg/ml至180mg/ml的抗体(作为活性成分)、55mM至160mM的甲硫氨酸和55mM至100mM的羟基丙基-γ-环糊精诸如2羟基丙基-γ-环糊精、3-羟基丙基-γ-环糊精、2,3-二羟基丙基-γ-环糊精或其组合。

[0058] 在根据本发明的液体药物制剂中包含的活性成分优选是抗体。优选地,抗体的等电点(pI)低于生理pH(~7.0)但高于制剂pH。在一个实施方案中,根据本发明的液体制剂及其实施方案包含1至200mg/ml的抗体,其中抗体的pI为5.0至6.9,优选5.3至6.9。

[0059] 优选地,根据本发明的液体药物制剂中包含的抗体特异性结合人硬骨素。

[0060] 当提及抗体时,术语“特异性结合人硬骨素”、“特异性地结合人硬骨素”和本文所用的等同物意指抗体将以足够的亲和力和特异性结合人硬骨素以实现生物学上有意义的效果。选定的抗体通常对人硬骨素具有结合亲和力,例如,抗体可以以100nM至1pM的Kd值结合人硬骨素。抗体亲和力可以例如通过基于表面等离子体共振的测定(surface plasmon resonance based assay),诸如BIAcore测定;酶联免疫吸附测定(ELISA);竞争测定(例如RIA)来测定。在本发明的含义内,特异性结合人硬骨素的抗体也可结合另一种分子,例如,小鼠硬骨素或诸如在双特异性抗体的情况下作为非限制性实例。

[0061] 硬骨素是由SOST基因编码的蛋白质,是由骨细胞分泌的糖蛋白,并且是成骨细胞

生成的高效抑制剂。SOST中的功能丧失突变与常染色体隐性遗传病症-硬化性狭窄相关,其导致进行性骨过度生长。SOST基因下游的缺失导致硬骨素表达减少,与称为van Buchem病的较轻微的疾病形式相关。此外,SOST-无义小鼠具有高骨量表型。

[0062] 特异性结合人硬骨素的抗体或其抗原结合片段优选还中和人硬骨素。

[0063] 如本文中所用,术语“中和”是指抑制或显著减弱其特异性结合的分子的生物学效应的抗体。因此,表述“抗体中和人硬骨素”是指特异性结合人硬骨素并抑制或显著减弱其生物学效应的抗体。

[0064] 如本文中所用,术语“抗体”或“多种抗体”是指单克隆或多克隆抗体。如本文中所用,术语“抗体”或“多种抗体”包括但不限于通过本领域已知的重组技术产生的重组抗体。

[0065] 优选地,包含在根据本发明的液体制剂中的抗体是特异性结合人硬骨素的单克隆抗体。

[0066] “抗体”或“多种抗体”包括任何物种的抗体,特别是哺乳动物物种的抗体(其具有两个基本上完整重链和两个基本上完整的轻链)、任何同种型的人抗体(包括IgA₁、IgA₂、IgD、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgG₄、IgE和IgM及其修饰变体)、非人灵长类动物抗体,例如,来自黑猩猩、狒狒、恒河猴或食蟹猴的抗体、啮齿动物抗体,例如来自小鼠、大鼠或兔子的抗体;山羊或马抗体以及骆驼抗体(例如来自骆驼或羊驼的抗体,诸如Nanobodies™)及其衍生物,或鸟类物种的抗体诸如鸡抗体或鱼类物种的抗体例如鲨鱼抗体。术语“抗体”或“多种抗体”还指“嵌合”抗体,其中至少一个重链和/或轻链抗体序列的第一部分来自第一物种,并且重链和/或轻链抗体序列的第二部分来自第二物种。本文中的目标嵌合抗体包括“灵长类化”抗体,其包含来源于非人灵长类动物(例如,东半球猴,诸如狒狒、恒河猴或食蟹猴)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列。“人源化”抗体是嵌合抗体,其含有来源于非人抗体的序列。在很大程度上,人源化抗体是人抗体(受者抗体),其中来自受者的高变区的残基被具有所需特异性、亲和力和活性的来自非人物种(诸如小鼠、大鼠、兔、鸡或非人灵长类动物)(供体抗体)的高变区[或互补决定区(CDR)]的残基取代。在大多数情况下,CDR外(即构架区(FR)内)的人(受者)抗体的残基另外地被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可包含在受者抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步完善抗体性能。人源化降低了人体内非人抗体的免疫原性,从而促进了抗体在人疾病治疗中的应用。人源化抗体和产生它们的几种不同技术是本领域熟知的。术语“抗体”或“多种抗体”也指人抗体,其可作为人源化的替代产生。例如,有可能产生转基因动物(例如小鼠),其在免疫后能够在不产生内源性鼠抗体的情况下产生完整的人抗体库。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移至此类种系突变型小鼠中将导致在用特定抗原免疫携带所述人种系免疫球蛋白基因的转基因动物后,产生对所述抗原具有特异性的人抗体。用于产生此类转基因动物的技术和用于从此类转基因动物分离和产生人抗体的技术是本领域已知的。或者,在转基因动物例如小鼠中,只有编码小鼠抗体可变区的免疫球蛋白基因被相应的人可变免疫球蛋白基因序列取代。编码抗体恒定区的小鼠种系免疫球蛋白基因保持不变。这样,抗体效应子在转基因小鼠的免疫系统中起作用,因此B细胞发育基本上不变,这可在体内抗原攻击后导致改善的抗体反应。一旦从此类转基因动物中分离出编码特定目标抗体的基因,就可用人恒定区基因替换编码恒定区的基因,以获得完全人抗体。如本文中所用,术语“抗体”或

“多种抗体”也指无糖基化抗体。

[0067] 如本文中所用,术语“其抗原结合片段”或其语法变体是指抗体片段。抗体片段包含至少一个本领域已知的重链或轻链免疫球蛋白结构域,并与一种或多种抗原结合。根据本发明的抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂以及Fv和scFv片段;以及双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体、结构域抗体(dAb)诸如sdAb、VHH和VNAR片段、单链抗体、从抗体片段或多个抗体形成的双特异性、三特异性、四特异性抗体或多特异性抗体,包括但不限于Fab-Fv或Fab-Fv-Fv构建体。如上定义的抗体片段是本领域已知的。

[0068] 作为活性成分包含在根据本发明的液体药物制剂中的抗体或其抗原结合片段可以是人或人源化抗体,优选特异性结合人硬骨素的人源化单克隆抗体。

[0069] 1) 更优选地,根据本发明的液体药物制剂包含:抗体或其抗原结合片段,其

[0070] a. 包含具有SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1;具有SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2;具有SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3;具有SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1;具有SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2,和具有SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3;或

[0071] b. 具有拥有SEQ ID NO:7中定义的序列的轻链可变区和拥有SEQ ID NO:8中定义的序列的重链可变区;或

[0072] 2) 抗体,其具有

[0073] a. 具有SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中定义的序列的重链;或

[0074] b. 具有SEQ ID NO:11中定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:12中定义的序列的重链。

[0075] 在整个说明书中,根据Kabat定义来定义互补决定区(“CDR”)。Kabat定义是对抗体中的残基进行编号的标准,并且其通常用于鉴定CDR区(Kabat等,(1991),第5版,NIH公开号91-3242)。

[0076] 序列示于下表1以及图1和2中。

[0077] 表1

[0078]

区域和 SEQ ID 标识符	氨基酸序列
CDR-H1 SEQ ID NO: 1	DYNMH
CDR-H2 SEQ ID NO: 2	EINPNSGGAGYNQKFKG
CDR-H3 SEQ ID NO: 3	LGYYDDIYDDWYFDV
CDR-L1 SEQ ID NO: 4	RASQDISNYLN
CDR-L2 SEQ ID NO: 5	YTSRLLS
CDR-L3 SEQ ID NO: 6	QQGDTLPYT
轻链可变区 SEQ ID NO: 7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLLSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGDTLPYTFGGGTKVEIK
重链可变区 SEQ ID NO: 8	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNSGGAGYNQ KFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARLGYYDDIYDDWYFDVWGQGTITVTVSS

[0079]

轻链 SEQ ID NO: 9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGDTLPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
重链 SEQ ID NO: 10	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNSGGAGYNQ KPKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARLGYYDDIYDDWYFDVWGQGTITVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFELYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSYMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[0080] 甚至更优选地,在根据本发明的液体药物制剂中作为活性成分包含的抗体是罗莫索单抗,一种如W02006119107和W02011143307 (通过引用并入本文) 中所述的抗人硬骨素抗体。

[0081] 具体地,本发明还提供了包含罗莫索单抗和环糊精的液体药物制剂,所述环糊精

优选选自 α -环糊精、 β -环糊精、二甲基- β -环糊精、三甲基- β -环糊精、随机甲基化的 β -环糊精、羟基乙基- β -环糊精、羟基丙基- β -环糊精(即2-羟基丙基- β -环糊精、3-羟基丙基- β -环糊精或2,3-二羟基丙基- β -环糊精)、羟异丁基- β -环糊精、磺丁基醚 β -环糊精、葡萄糖基- β -环糊精、麦芽糖基- β -环糊精、 γ -环糊精、羟基丙基- γ -环糊精(即2-羟基丙基- γ -环糊精、3-羟基丙基- γ -环糊精或2,3-二羟基丙基- γ -环糊精)、含环糊精的聚合物或其组合,更优选包含罗莫索单抗和羟基丙基- γ -环糊精的液体药物制剂。

[0082] 根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂可含有缓冲剂以在储存和给药期间保持恒定的pH。在液体药物制剂领域中使用许多缓冲剂,诸如但不限于柠檬酸盐、磷酸盐、乳酸盐、组氨酸、谷氨酸盐、马来酸盐、酒石酸盐或琥珀酸盐。优选缓冲剂种类通常选自具有与获得最佳蛋白质稳定性所需的优选pH接近(± 1 pH单位)的pKa(以保持高缓冲能力)的那些缓冲剂,并且与对于特定蛋白质(当被置于一系列不同的缓冲剂种类中时)观察到的得以证明的最大稳定性相关。制剂的适当pH范围通常选自与对于特定蛋白质(当被置于一系列不同的pH制剂中时)观察到的得以证明的最大稳定性相关的那些pH范围。

[0083] 在本发明的一个具体实施方案中,根据本发明任一实施方案的液体药物制剂包含醋酸钠,优选浓度为10mM至100mM,10mM至80mM,10mM至60mM,25mM至60mM,优选40mM至60mM,或50mM。根据本发明的液体药物制剂也可包含醋酸钙,优选浓度为0.5mM至50mM,5mM至40mM,10mM至30mM,或14mM。更优选地,根据本发明的液体药物制剂包含50mM醋酸钠和14mM醋酸钙。

[0084] 在另外一个实施方案中,根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂可具有4至7.5,优选4至6,优选4.5至5.5,或5.2的pH。

[0085] 在另外一个实施方案中,根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂另外包含表面活性剂。本领域技术人员知道可用于根据本发明任何实施方案的液体制剂中的表面活性剂的选择,诸如但不限于聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、卵磷脂、泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188)、十二烷基硫酸钠(SDS)、月桂基硫酸钠、辛基糖苷钠、月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-肌氨酸、亚油基-、肉豆蔻基-或十六烷基-甜菜碱、月桂酰胺丙基-、椰油酰胺丙基-、亚油酰胺丙基-、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-二甲胺、甲基椰油基牛磺酸钠、或甲基油基-牛磺酸二钠、聚乙二醇、聚丙二醇以及乙烯与丙二醇的共聚物。在本发明的另外的实施方案中,液体药物制剂可包含聚山梨醇酯20。

[0086] 本发明的液体制剂可包含0.001%至10%的聚山梨醇酯20,0.001%至5%的聚山梨醇酯20,0.001%至1%的聚山梨醇酯20,0.001%至0.006%的聚山梨醇酯20,或0.006%的聚山梨醇酯20。

[0087] 根据本发明的实施方案的液体制剂还可包含通常用于制备液体药物制剂的另外的赋形剂,包括但不限于糖(例如蔗糖或海藻糖)、聚乙二醇(例如PEG100,PEG300,PEG600,PEG1500,PEG2000,PEG3000,PEG3350,PEG4000,PEG6000,PEG8000或PEG20000)、多元醇(例如甘露醇、山梨糖醇或乳糖醇)、除甲硫氨酸外的其他氨基酸、聚乙烯吡咯烷酮、三甲胺N-氧化物、三甲基甘氨酸或其组合。

[0088] 具体地,根据本发明的实施方案的液体制剂还可包含蔗糖,0%至6%的蔗糖,更优

选6%的蔗糖。

[0089] 在另一个实施方案中,根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂包含1mg/ml至200mg/ml的抗体,10mM至55mM的醋酸钠,0至14mM的醋酸钙,0%至6%的蔗糖、0%至0.006%的聚山梨醇酯20,55mM至80mM的化学修饰的环糊精,55mM至160mM的甲硫氨酸,pH 5.2;更优选90mg/ml至180mg/ml,甚至更优选120mg/ml至180mg/ml的抗体,其中化学修饰的环糊精优选选自单、二或三甲基-β-环糊精、随机甲基化的β-环糊精、羟基乙基-β-环糊精、羟基丙基-β-环糊精(即2-羟基丙基-β-环糊精、3-羟基丙基-β-环糊精或2,3-二羟基丙基-β-环糊精)、羟基异丁基-β-环糊精、磺基丁醚-β-环糊精、葡萄糖基-β-环糊精、麦芽糖基-β-环糊精、羟基丙基-γ-环糊精(即2-羟基丙基-γ-环糊精、3-羟基丙基-γ-环糊精或2,3-二羟基丙基-γ-环糊精)或其组合。

[0090] 在一个另外的实施方案中,根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂包含1mg/ml至200mg/ml的抗体,10mM至55mM的醋酸钠,0至14mM的醋酸钙,0%至6%的蔗糖,0%至0.006%的聚山梨醇酯20,55mM至80mM的羟基丙基-γ-环糊精,55mM至160mM的甲硫氨酸,pH 5.2;更优选90mg/ml至180mg/ml,甚至更优选120mg/ml至180mg/ml的抗体。

[0091] 在一个优选实施方案中,根据本发明的液体药物制剂包含至少90mg/ml的抗体,55mM的羟基丙基-γ-环糊精,125mM的甲硫氨酸,pH为5的55mM醋酸钠缓冲液,14mM的醋酸钙,6%的蔗糖和0.006%的聚山梨醇酯20,其中所述抗体是抗人硬骨素抗体。甚至更优选地,根据本发明的液体药物制剂包含至少90mg/ml的抗体,55mM的羟基丙基-γ-环糊精,125mM的甲硫氨酸、pH为5的55mM的醋酸钠缓冲液,14mM醋酸钙,6%的蔗糖和0.006%的聚山梨醇酯20,其中抗体是抗人硬骨素抗体,该制剂用于皮下施用。

[0092] 在另一个实施方案中,根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂表现出800mOsm/l或更低的重量摩尔渗透压浓度和/或80cP或更低的粘度。

[0093] 在一个实施方案中,液体制剂不是水凝胶。在一个实施方案中,液体制剂包含至少2%,至少5%,至少10%,至少25%,2%至90%,2%至75%,或2%至50%的水。

[0094] 根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂可用于治疗与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关的骨病症。另外,本发明提供了用于治疗哺乳动物受试者中与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关的骨病症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂。此外,本发明还提供了根据本发明的任一实施方案的液体制剂在制备用于治疗骨病症的药剂中的用途,所述骨病症与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关。

[0095] 哺乳动物受试者可选自啮齿类动物、猫、狗、马、牛、绵羊、非人灵长类动物和人受试者。优选地,哺乳动物受试者是人受试者。

[0096] 本发明通常用于治疗或帮助预防与低骨形成、低骨矿物质密度、低骨矿物质含量、低骨量、骨质量低、骨强度低中的至少一种相关的骨病症。骨病症的特征在于硬骨素的功能改变或相关组织(例如骨,软骨)中硬骨素的表达增加/减少。例如,本发明可以例如用于增加骨形成、骨矿物质密度、骨矿物质含量、骨量、骨质量和骨强度中的至少一种。

[0097] 骨病症可能与异常的成骨细胞或破骨细胞活性有关,与降低的骨密度、增加的骨吸收和/或骨相关病症(即骨质疏松症)相关。具体地,骨病症可选自软骨发育不全、锁骨颅

骨发育不良、内生软骨瘤病、纤维发育不良、戈谢病、低磷血症性佝偻病、马方氏综合征、多发性遗传性外生骨疣、神经纤维瘤病、成骨不全、骨硬化症、全身脆弱性骨硬化、硬化病变、假关节炎、化脓性骨髓炎、牙周病、抗癫痫药物诱发的骨丢失、原发性和继发性甲状旁腺功能亢进、家族性甲状旁腺功能亢进综合征、失重诱发的骨丢失、男性骨质疏松症、绝经后骨丢失、骨关节炎、肾性骨营养不良、骨浸润性疾病、口腔骨丢失、下颌骨坏死、青少年佩吉特病、局限性吝状过骨、代谢性骨病、肥大细胞增多症、镰状细胞贫血/疾病、器官移植相关性骨丢失、肾移植相关性骨丢失、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、癫痫、青少年关节炎、地中海贫血、粘多糖贮积症、法布里病、特纳综合征、唐氏综合征、Klinefelter综合征、麻风病、佩特兹病、青少年特发性脊柱侧凸、婴儿期发作多系统炎症性疾病(infantile onset multi-system inflammatory disease)、Winchester综合征、门克斯病、威尔逊病、缺血性骨病(诸如Legg-Calve-Perthes病、区域性迁移性骨质疏松症)、贫血状态、类固醇诱发的病况、糖皮质激素诱发的骨丢失、肝素诱发的骨丢失、骨髓疾病、坏血病、营养不良、缺钙、骨质疏松症、骨质减少、酒精中毒、慢性肝病、绝经后状态、慢性炎症、类风湿性关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、炎性结肠炎、克罗恩病、月经稀发、闭经、妊娠、糖尿病、甲状腺功能亢进、甲状腺疾病、甲状旁腺疾病、库欣病、肢端肥大症、性腺机能减退、固定或废用、反射性交感神经营养不良综合征、局部骨质疏松症、骨软化病、骨缝隙缺损(bone gap defect)、牙槽骨质丢失、与关节置换相关的骨丢失、HIV相关骨丢失、与生长激素丧失相关的骨丢失、与囊性纤维化相关的骨丢失、化疗相关的骨丢失、肿瘤诱导的骨丢失、癌症-相关的骨丢失、激素烧蚀性骨丢失、多发性骨髓瘤、药物诱发的骨流失、神经性厌食症、疾病相关的面骨丢失、疾病相关的头盖骨丢失、疾病相关的颌骨丢失、疾病相关的颅骨损失、与衰老相关的骨丢失、与衰老相关的面骨丢失、与衰老相关的颅骨丢失、与衰老相关的头盖骨丢失、与衰老相关的颅骨损失和与太空旅行相关的骨丢失及其组合。

[0098] 可以在本发明的上下文中治疗与这些病症相关的骨丢失、降低的骨矿物质密度、减小的骨体积和/或降低的骨矿物质含量。在一个实例中，待治疗的受试者可能怀孕。例如，本发明可用于帮助妊娠相关的骨丢失。本发明通常可用于减缓或逆转骨丢失。

[0099] 在一个优选实施方案中，待治疗的骨病症是骨质疏松症或骨质减少症。在一个实例中，待治疗的哺乳动物受试者是绝经后妇女，例如患有骨质疏松症的妇女，特别是处于增加的或高的骨折风险中的受试者，或者其他可用的骨质疏松症疗法已经失败或不耐受其他可用的骨质疏松症疗法的受试者。在进一步的实例中，本发明可用于改善哺乳动物中的结果，所述哺乳动物正在经历矫形外科手术、牙科手术、植入手术、关节置换、骨移植、骨整容手术和骨修复诸如骨折愈合、骨不连接愈合、延迟的连接愈合和面部重建中的一种或多种。

[0100] 在另一个优选实施方案中，受试者患有骨折或被认为有骨折的风险。例如，受试者可能具有将他们鉴定为有骨折风险的骨矿物质密度。受试者可能最近因骨折而被诊断出患有骨病症。在某些情况下，受试者的手腕、手臂、腿、髋部或椎骨可能骨折，并且在某些情况下，骨折可能已导致骨病症的诊断。

[0101] 优选地，所述骨病症选自骨质疏松症、骨缝隙缺损、牙槽骨丢失、被抑制的骨吸收或其组合。

[0102] 本发明还提供了用于减少哺乳动物受试者的注射部位处的炎症的方法，其包括施用治疗有效量的根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂。

[0103] 以治疗有效量施用根据本发明的液体药物制剂。如本文中所用,术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防靶向疾病、病症或病况,或表现出可检测的治疗、药理学或预防效果所需的治疗剂(即活性成分)的量。对于任何抗体或其抗原结合片段,最初可以在细胞培养测定中或在动物模型中(通常在啮齿类动物、兔、狗、猪或灵长类动物中)估计治疗有效量。动物模型也可用于确定施用的合适浓度范围和途径。然后,可将此类信息用于确定人中施用的有用剂量和途径。

[0104] 针对人受试者的精确治疗有效量将取决于疾病状态的严重程度、受试者的一般健康状况、受试者的年龄、体重和性别、饮食、施用的时间和频率、药物组合、对治疗的反应敏感性和耐受性/反应。该量可以通过常规实验确定,并且在临床医生的判断范围内。通常,治疗有效量的抗体为0.01mg/kg至500mg/kg,例如0.1mg/kg至200mg/kg,诸如100mg/kg。

[0105] 液体药物制剂可以方便地以每剂量含有预定量的本发明活性剂的单位剂型提供。

[0106] 对于上述疾病和/或病症的治疗,适当的剂量将根据例如待使用的特定抗体、被治疗的受试者、施用方式和所治疗的病症的性质和严重程度而变化。在一个具体实施方案中,本发明的液体药物制剂通过静脉内或皮下途径施用。当通过静脉内注射施用,可将其以推注或连续输注的方式施用。根据本发明的任一实施方案的液体药物制剂也可通过肌肉注射施用。可使用注射器、注射装置诸如自动注射器、无针装置、植入物和贴片注射液体药物制剂。本发明的液体药物制剂还可使用用于此类递送的含有所述制剂的吸入装置(例如使用喷雾器或液体吸入器)通过吸入施用。

[0107] 本发明的液体药物制剂适合于一次或在一系列治疗中向患者施用,并且可在诊断之后的任何时间向患者施用;其可作为唯一的治疗施用,或与用于治疗本文前述的病况的其他药物或疗法联合施用。

[0108] 抗体或其抗原结合片段可以是液体药物制剂中的唯一活性成分。或者,可将抗体或其抗原结合片段与一种或多种其他治疗活性成分例如同时、依次或分开地组合施用。如本文中所用,活性成分是指在相关剂量下具有药理学作用(诸如治疗效果)的成分。在一些实施方案中,液体药物制剂中的抗体或其抗原结合片段可以伴有其他活性成分,包括其他抗体或非抗体成分。当根据本发明的液体药物制剂中的抗体是抗硬骨素抗体时,可向受试者施用另外的活性成分以治疗其骨病症。例如,受试者可用治疗骨病的任何其他疗法来治疗。在一个实施方案中,向受试者施用抗再吸收剂,在一个特别优选的实例中,当受试者未用根据本发明和其实施方案的液体药物制剂治疗时施用另外的药剂。在一个替代实施方案中,可将这种另外的活性成分与根据本发明的液体药物制剂的施用同时施用或重叠施用。在本文论述的任何实施方案中,另外的药剂可以是例如维生素D。在一些实施方案中,其他治疗活性成分可以是骨再吸收抑制剂。例如,可使用任何合适的抗再吸收剂。在一个优选实施方案中,骨吸收抑制剂是二膦酸盐,特别是含氮二膦酸盐。二膦酸盐的实例包括但不限于阿伦膦酸盐、bonefos屈膦酸盐,依替膦酸盐,伊班膦酸,奥膦酸盐,利奈膦酸盐,利塞膦酸钠,skelid和唑来膦酸。在另一个优选实施方案中,二膦酸盐是唑来膦酸。可使用的二膦酸盐包括例如Actonel™、Aclasta™/Reclast™、Boniva™/Bonviva™、Fosamax™和Zometa™。在包含抗硬骨素抗体和双膦酸盐的液体药物制剂之间交替的有利方面在于其可帮助避免由用双膦酸盐长时间治疗的受试者引起的可能的副作用。因此,交替有助于避免这种副作用,同时还解决了对抗体产生耐药性的问题。在一个优选实施方案中,另外的活性成分是抗再

吸收剂,甚至更优选是阿仑膦酸盐。

[0109] 选择的雌激素受体调节剂也可用作骨吸收抑制剂,例如,阿佐昔芬、巴多昔芬、FC 1271、拉索昔芬、雷洛昔芬和替勃龙是合适的SERM的实例。可以使用的其他骨吸收抑制剂包括雌激素和降钙素,降钙素的实例包括鲑降钙素,例如MiacalcinTM。

[0110] 锆化合物,特别是雷奈酸锆,或PTH,特别是重组甲状旁腺激素释放肽、甲状旁腺激素或其类似物(例如特立帕肽(**FORTEO**®)),也可用作骨吸收抑制剂。

[0111] 在其他实施方案中,骨吸收抑制剂是RANKL抑制剂,诸如抗RANKL抗体。在一个优选实施方案中,所用的骨吸收抑制剂可以是地舒单抗。

[0112] 在其他实施方案中,所采用的抗再吸收剂不是二膦酸盐。可使用的此类试剂的实例包括**PROLIA**®、降钙素和组织蛋白酶K抑制剂(例如,奥当卡替)。

[0113] 在一种情况下,可将骨吸收抑制剂与抗体同时或大致同时施用,或两种疗法重叠。骨吸收抑制剂有可能通过减少抗体刺激的骨的分解来帮助进一步延长抗硬骨素抗体的作用,特别是在化合物是二膦酸盐的情况下。在一个优选实例中,在用抗硬骨素抗体治疗受试者和对骨病症的进一步治疗中没有重叠,例如两种治疗是交替的,但从不重叠。

[0114] 抗体分子通常可通过以下方式产生:在适于导致从编码本发明的抗体分子的DNA表达蛋白质的条件下培养含有编码抗体序列的载体的宿主细胞,以及分离所述抗体分子。

[0115] 抗体分子可以仅包含重链或轻链多肽,在这种情况下,仅需要使用重链或轻链多肽编码序列来转染宿主细胞。为了产生包含重链和轻链的产物,可用两种载体转染细胞系,第一载体编码轻链多肽,第二载体编码重链多肽。或者,可使用单一载体,该载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0116] 可以通过培养用一种或多种编码重组抗体片段的表达载体转染的真核宿主细胞来产生可以按照工业规模制备的抗体或其抗原结合片段。真核宿主细胞优选是哺乳动物细胞,更优选是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0117] 哺乳动物细胞可以在任何支持其生长和重组蛋白表达的培养基中培养,优选培养基是化学成分确定的培养基,其不含动物源性产品,诸如动物血清和蛋白胨。存在可供本领域技术人员使用的不同的细胞培养基,其包含以适当浓度存在的维生素、氨基酸、激素、生长因子、离子、缓冲剂、核苷、葡萄糖或等效能源的不同组合,以使细胞能够生长和产生蛋白质。可在细胞培养周期过程中的不同时间将另外的细胞培养基组分以适当的浓度包含在细胞培养基中,这是本领域技术人员已知的。

[0118] 哺乳动物细胞培养可以在任何合适的容器诸如摇瓶或生物反应器中进行,可以以或不以补料分批模式操作所述细胞培养,这取决于所需的生产规模。这些生物反应器可以是搅拌罐或气升式反应器。可提供容量超过1,000L至50,000L,优选为5,000L至20,000L,或至10,000L的各种大规模生物反应器。或者,也可使用较小规模的生物反应器,诸如2L至100L的生物反应器来制备抗体或抗体片段。

[0119] 抗体或其抗原结合片段通常存在于哺乳动物宿主细胞培养物(通常为CHO细胞培养物)的上清液中。对于其中目标蛋白质诸如抗体或其抗原结合片段被分泌在上清液中的CHO培养过程,通过本领域已知的方法,通常通过离心收集所述上清液。

[0120] 因此,抗体或其抗原结合片段的生产方法包括在细胞培养后并且在蛋白质纯化前

的离心和上清液回收步骤。在一个另外的具体实施方案中,所述离心是连续离心。为避免疑义,上清液指的是位于由细胞培养物的离心产生的沉降细胞上方的液体。

[0121] 或者,宿主细胞是原核细胞,优选革兰阴性细菌。更优选地,宿主细胞是大肠杆菌(*E.coli*)细胞。用于蛋白质表达的原核宿主细胞是本领域熟知的(Terpe, K. Appl Microbiol Biotechnol 72, 211-222 (2006))。宿主细胞是重组细胞,其已经过基因工程改造以产生目标蛋白质,诸如抗体的抗原结合片段。重组大肠杆菌宿主细胞可来源于任何合适的大肠杆菌菌株,包括MC4100、TG1、TG2、DHB4、DH5 α 、DH1、BL21、K12、XL1Blue和JM109。一个实例是大肠杆菌菌株W3110(ATCC 27,325),其是用于重组蛋白质发酵的常用宿主菌株。抗体片段还可通过培养经修饰的大肠杆菌菌株,例如代谢突变体或具有蛋白酶缺陷的大肠杆菌菌株来产生。

[0122] 抗体片段通常存在于大肠杆菌宿主细胞的周质中或宿主细胞培养上清液中,这取决于蛋白质的性质、生产规模和所用的大肠杆菌菌株。用于将蛋白质靶向这些区室的方法是本领域熟知的(Makrides, S.C.; Microbiol Rev 60, 512-538 (1996))。将蛋白质导向大肠杆菌周质的合适信号序列的实例包括大肠杆菌PhoA、OmpA、OmpT、LamB和OmpF信号序列。可通过依赖天然分泌途径或通过诱导外膜的有限渗漏以引起蛋白质分泌(其实例是pe1B前导序列、蛋白A前导序列的使用、细菌素释放蛋白(丝裂霉素诱导的细菌素释放蛋白)的共表达以及向培养基中添加甘氨酸和用于膜透化的kil基因的共表达)来将蛋白质靶向上清液。最优选地,在宿主大肠杆菌的周质中表达重组蛋白。

[0123] 重组蛋白在大肠杆菌宿主细胞中的表达也可在诱导型系统的控制下,由此重组抗体在大肠杆菌中的表达处于诱导型启动子的控制之下。适用于大肠杆菌的许多诱导型启动子是本领域熟知的,并且取决于启动子,重组蛋白的表达可以通过改变因素诸如温度或生长培养基中特定物质的浓度来诱导。诱导型启动子的实例包括可用乳糖或不可水解的乳糖类似物异丙基-b-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)诱导的大肠杆菌lac、tac和trc启动子,和分别由磷酸盐、色氨酸和L-阿拉伯糖诱导的phoA、trp和araBAD启动子。表达可以通过例如添加诱导物或温度变化来诱导,其中诱导是温度依赖性的。当通过向培养物中添加诱导物来实现重组蛋白表达的诱导时,可通过任何合适的方法添加诱导物,这取决于发酵系统和诱导物,例如,通过单次或多次快速添加(shot additions)或通过诱导物的逐步添加(通过进料)。应当理解,在诱导物的添加与蛋白质表达的实际诱导之间可能存在延迟,例如在诱导物是乳糖的情况下,在诱导蛋白质表达发生之前可存在延迟,因为在使用乳糖之前使用任何预先存在的碳源。

[0124] 可将大肠杆菌宿主细胞培养物(发酵)在任何支持大肠杆菌生长和重组蛋白表达的培养基中进行培养。培养基可以是任何化学成分确定的培养基,诸如,例如Durany 0等(2004). Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. Process Biochem 39, 1677-1684中描述的所述培养基。

[0125] 大肠杆菌宿主细胞的培养可在任何合适的容器诸如摇瓶或发酵罐中进行,这取决于所需的生产规模。可提供各种大规模发酵罐,其容量超过1,000升至约100,000升。优选使用1,000至50,000升,更优选1,000至25,000升、20,000升、15,000升、12,000升或10,000升的发酵罐。还可使用容量为0.5升至1,000升的较小规模的发酵罐。

[0126] 可在任何合适的系统(例如连续、分批或补料分批模式,这取决于蛋白质和所需的

产率)中进行大肠杆菌的发酵。在需要时,可将分批模式用于营养物或诱导物的快速添加。或者,可使用补料分批培养,并且培养物在诱导前以最大比生长速率在分批模式下生长,这可使用最初存在于发酵罐中的营养物和用于控制生长速率直至发酵完成的一种或多种营养物进料方案来维持。补料分批模式也可在诱导前被用于控制大肠杆菌宿主细胞的代谢并允许达到较高的细胞密度。

[0127] 如果需要,可从发酵培养基中收集宿主细胞,例如,可通过离心、过滤或浓缩从样品中收集宿主细胞。在这种情况下,该方法通常包括在提取蛋白质之前进行离心和细胞回收的步骤。

[0128] 对于其中目标蛋白质诸如抗体或抗体的抗原结合片段存在于宿主细胞的周质空间中的大肠杆菌发酵过程,需要从宿主细胞释放蛋白质。释放可通过任何合适的方法实现,所述方法是诸如通过机械或压力处理、冻融处理、渗透休克、提取剂或热处理进行的细胞裂解。用于蛋白质释放的此类提取方法是本领域熟知的。因此,在一个特定实施方案中,生产方法包括在蛋白质纯化之前的另外的蛋白质提取步骤。

[0129] 用于体外获得人抗体的抗原结合片段的其他方法基于展示技术,诸如噬菌体展示或核糖体展示技术,其中使用至少部分人工产生的或来自供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库的重组DNA文库。用于产生人抗体的噬菌体和核糖体展示技术是本领域熟知的。还可从分离的人B细胞产生人抗体,所述人B细胞用目标抗原进行离体免疫,随后将其融合以产生杂交瘤,然后可以对其筛选最佳人抗体。

实施例

[0130] 实施例1:羟基丙基- γ -环糊精(HPGCD)筛选

[0131] 稳定性和在制剂中沉淀的倾向受到浓度(空间拥挤)和制剂中使用的赋形剂的极大影响,所述赋形剂控制由于空间拥挤而观察到的相互作用。

[0132] 为了确定HPGCD在生理pH下是否对沉淀特征有影响,通过pH变换模型运行具有和不具有HPGCD的浓度为120mg/ml的罗莫索单抗的基本制剂(pI6.9)。

[0133] 设计pH变换模型以重复当通过皮下注射施用包含药物的制剂时发生的pH变换(Elena García-Fruitós, Insoluble Proteins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 第1258卷, 第18章:321-330, Springer Science+Business Media New York (2015))。通常在生理pH($\sim$ pH7.0)下配制生物治疗性蛋白质,特别是抗体。如果蛋白质的pI小于pH 7.0但高于制剂pH,则蛋白质将变化通过其pI。这将降低蛋白质的溶解度并使其沉淀。该模型被设计来重复这种pH变换,并帮助评估制剂对皮下注射的适应性。

[0134] 将该模型运行24小时。在前一天制备组织缓冲液(10mM碳酸氢钠和150mM氯化钠),并将其在37°C/7%CO₂下在温和搅拌下放入CO₂培养箱中过夜以进行平衡。按照制造商的说明书(Thermo Scientific, Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes G2, Prod#87727, 7000MWC0, 0.5mL)将约0.5mL的每种测试样品加载到slide-a-lyzer盒中。将slide-a-lyzer盒轻轻放入CO₂培养箱内的平衡组织缓冲液中并放置过夜。在最初的4-6小时中以及随后在24小时(或更长时间)后每小时就沉淀的迹象在白色和黑色背景下目视评估slide-a-lyzer盒。

[0135] 通过进行1:1的连续稀释来制备在50mM醋酸钠, 14mM醋酸钙, 6%蔗糖, 0.006%聚

山梨醇酯20 (pH 5.2) (药物溶液, DS) 中的120mg/ml 罗莫索单抗。通过向DS中的120mg/ml 罗莫索单抗2ml中加入881mg HPGCD来制备初始溶液, 得到250mM的终HPGCD浓度。将一半的该溶液(1mL) 与相同体积的DS中的120mg/ml 罗莫索单抗以1:1混合, 以在具有125mM HPGCD的DS中获得120mg/ml 罗莫索单抗样品。重复该过程以获得具有62.5mM、31.25mM、15.63mM和7.8mM HPGCD的DS中的120mg/ml 罗莫索单抗样品。将DS中的120mg/ml 罗莫索单抗用作对照。

[0136] 将包含0至250mM浓度的HPGCD的制剂进行缓冲液交换, 并使用不同体积(2-20mL) 的30kDa Sartorius Viva Spin离心旋转过滤器浓缩。将旋转管在3000rpm, 5℃下离心≤60分钟。使用≥5倍体积交换的容积式移液管在旋转循环之间混合样品。

[0137] 使用与Cary 50分光光度计连接的C Technologies Solo VPE高浓度UV分光光度计, 在透析之前和之后(表2) 以一式两份测量每个样品的浓度。通过在 λ 280处的吸光度确定浓度。结果报告为一式两份样品读数的平均值。使用Hach H260G pH计和ISFET固态探针测定pH。将所有样品在制备后于5℃下储存。

[0138] 表2

[0139]

透析前					
样品	重复		平均值	SD	%CV
	1	2			
0 mM HPGCD	122.18	120.58	121.38	1.13	0.93
7.8 mM HPGCD	120.15	120.60	120.38	0.32	0.26
15.6 mM HPGCD	122.61	120.80	121.71	1.28	1.05
31.3 mM HPGCD	118.52	119.04	118.79	0.36	0.31
62.5 mM HPGCD	114.86	115.69	115.28	0.59	0.51
125 mM HPGCD	109.36	109.20	109.29	0.11	0.10
250 mM HPGCD	96.77	96.82	96.8	0.03	0.03
透析后					
样品	重复		平均值	SD	%CV
	1	2			
0 mM HPGCD	29.18	28.99	29.1	0.13	0.45
7.8 mM HPGCD	29.42	27.66	28.5	1.24	4.35
15.6 mM HPGCD	26.89	26.78	26.8	0.08	0.29
31.3 mM HPGCD	27.25	27.35	27.3	0.07	0.26
62.5 mM HPGCD	28.98	28.78	28.9	0.14	0.49
125 mM HPGCD	—	—	—	—	—
250 mM HPGCD	—	—	—	—	—

[0140] 在开始5小时内每小时和72小时后进行样品的视觉评估。结果报告于表3中。HPGCD的添加降低了沉淀速率。

[0141] 表3

[0142]

时间 (小时)	沉淀评估						
	0 mM HPGCD	7.8 mM HPGCD	15.6 mM HPGCD	31.3 mM HPGCD	62.5 mM HPGCD	125 mM HPGCD	250 mM HPGCD

[0143]

0	无	无	无	无	无	无	无
1	轻度	轻度	轻度	轻度	无	无	无
2	中度	中度	中度	中度	轻度	无	无
3	重度	重度	重度	重度	中度	无	无
4	重度	重度	重度	重度	中度	轻度	无
5	重度	重度	重度	重度	重度	轻度	无
72	重度	重度	重度	重度	重度	中度	轻度

[0144] 实施例2:甲硫氨酸筛选

[0145] 一旦评估了HPGCD对实施例1的基本罗莫索单抗制剂的沉淀特征的影响,就研究甲硫氨酸的作用。

[0146] 为了确定甲硫氨酸在生理pH下是否对沉淀特征有影响,通过实施例1中描述的pH变换模型运行具有(55mM和200mM)和不具有甲硫氨酸的浓度为90mg/ml(仅对照)、120mg/mL或180mg/ml罗莫索单抗的基本制剂(pI 6.9)。

[0147] 使用30kDa Sartorius Viva Spin离心旋转过滤器将50mM醋酸钠,14mM醋酸钙,6%蔗糖,0.006%聚山梨醇酯20(pH 5.2)(药物溶液,DS)中的罗莫索单抗浓缩至125mg/ml或至190mg/ml。将旋转管在3000rpm、5℃下离心≤60分钟;使用容积式移液管在旋转循环之间混合样品。

[0148] 使用分析天平称量产生2.2mL具有所需浓度(55和200mM)的样品的所需甲硫氨酸的量(分别为0.018g和0.0066g)。将甲硫氨酸溶解在2.2mL适当的蛋白质溶液(125mg/ml或190mg/ml)中。

[0149] 使用与Cary 50分光光度计连接的C Technologies Solo VPE高浓度UV分光光度计,在透析之前和之后(表4)以一式两份测量每个样品的浓度。通过在 λ_{280} 处的吸光度确定浓度。结果报告为一式两份样品读数的平均值。

[0150] 表4

[0151]

透析前					
样品	重复		平均值	SD	%CV
	1	2			
120 mg/ml 55 mM Meth	122.39	124.35	123.38	1.39	1.12

[0152]

120 mg/ml 200 mM Meth	121.81	124.43	123.13	1.85	1.51
180 mg/ml 55 mM Meth	188.84	187.96	188.40	0.62	0.33
180 mg/ml 200 mM Meth	186.70	186.69	186.70	0.01	0.00
90 mg/ml 对照	90.93	91.32	91.13	0.27	0.30
120 mg/ml 对照	118.18	119.16	118.67	0.69	0.58
180 mg/ml 对照	182.90	183.31	183.11	0.29	0.16
透析后					
样品	重复		平均值	SD	%CV
	1	2			
120 mg/ml 55 mM Meth	24.64	24.57	24.61	0.05	0.22
120 mg/ml 200 mM Meth	24.38	24.41	24.40	0.01	0.08
180 mg/ml 55 mM Meth	31.39	31.58	31.49	0.13	0.42
180 mg/ml 200 mM Meth	30.75	30.57	30.66	0.12	0.40
90 mg/ml 对照	22.51	22.60	22.56	0.06	0.28
120 mg/ml 对照	23.54	23.57	23.56	0.02	0.10
120 mg/ml 对照	31.47	31.30	31.39	0.12	0.39

[0153] 使用Hach H260G pH计和ISFET固态探针测量的透析前和24小时后制剂的pH证实了pH变换(表5)。

[0154] 表5

[0155]

样品	pH		粘度 (cP)	重量摩尔渗透压浓度 (mOsmol)
	t0	t24		
120 mg/ml 55 mM Meth	5.14	7.80	5.21	392
120 mg/ml 200 mM Meth	5.28	7.81	5.55	573

[0156]

180 mg/ml 55 mM Meth	5.23	7.75	34.36	508
180 mg/ml 200 mM Meth	5.23	7.73	29.56	712
90 mg/ml 对照	5.27	7.86	2.55	321
120 mg/ml 对照	5.22	7.80	4.76	320
180 mg/ml 对照	5.28	7.77	27.21	398
组织缓冲液	6.99			

[0157] 在前四个小时中每小时进行样品的视觉评估。结果报告于表6中。

[0158] 表6

[0159]

时间 (小时)	120 mg/ml 55 mM Meth	120 mg/ml 200 mM Meth	180 mg/ml 55 mM Meth	180 mg/ml 200 mM Meth	90 mg/ml 对照	120 mg/ml 对照	180 mg/ml 对照
0	无	无	无	无	无	无	无
1	轻度	轻度	重度	重度	极轻度	轻度	中度
2	重度	重度	极重度	极重度	中度	中度	极重度
3	重度	重度	极重度	极重度	重度	重度	极重度
4	重度	重度	极重度	极重度	重度	重度	极重度

[0160] 如从表6中报告的结果可观察到的,添加甲硫氨酸单独不会改变沉淀速率。

[0161] 实施例3:HPGCD与甲硫氨酸筛选的组合

[0162] 一旦评估了单独的HPGCD或单独的甲硫氨酸对实施例1的基本罗莫索单抗制剂的沉淀特征的影响,就研究HPGCD和甲硫氨酸的组合作用。

[0163] 使用30kDa Sartorius Viva Spin离心旋转过滤器将在50mM醋酸钠,14mM醋酸钙,6%蔗糖,0.006%聚山梨醇酯20 (pH 5.2) (药物溶液,DS) 中的罗莫索单抗浓缩至125mg/ml或至190mg/ml。将旋转管在3000rpm、5℃下离心≤60分钟;使用容积式移液管在旋转循环之间混合样品。

[0164] 使用分析天平称量产生2.2mL具有所需浓度(55和200mM)的样品所需的甲硫氨酸的量(分别为0.018g和0.066g)。将甲硫氨酸溶于2.2mL适当的蛋白质溶液(125mg/ml或190mg/ml)中。使用分析天平称量所需量(0.053g)的HPGCD以产生1mL所需浓度的30mM HPGCD。用1ml该适当的蛋白质/甲硫氨酸溶液溶解HPGCD。

[0165] 如先前在实施例1和2中所述,将制剂进行缓冲液交换并浓缩。如先前在实施例1和

2中所述,在透析之前和之后(表7)以一式两份测量每种样品的浓度。结果报告为一式两份样品读数的平均值。

[0166] 表7

[0167]

透析前					
样品	重复		平均值	SD	%CV
	1	2			
120 mg/ml 55 mM Meth+ 30 mM HPGCD	118.83	121.55	120.19	1.92	1.60
120 mg/ml 200 mM Meth+ 30 mM HPGCD	118.63	119.00	118.82	0.26	0.22
180 mg/ml 55 mM Meth+ 30 mM HPGCD	184.44	185.70	185.08	0.89	0.48
180 mg/ml 200 mM Meth+ 30 mM HPGCD	182.84	181.63	182.24	0.86	0.47
90 mg/ml 对照	90.93	91.32	91.13	0.27	0.30
120 mg/ml 对照	118.18	119.16	118.67	0.69	0.58
180 mg/ml 对照	182.90	183.31	183.11	0.29	0.16
透析后					
样品	重复		平均值	SD	%CV
	1	2			
120 mg/ml 55 mM Meth+ 30 mM HPGCD	21.65	21.61	21.63	0.02	0.11
120 mg/ml 200 mM Meth+ 30 mM HPGCD	21.23	21.34	21.29	0.07	0.36
180 mg/ml 55 mM Meth+ 30 mM HPGCD	27.37	27.66	27.52	0.20	0.74
180 mg/ml 200 mM Meth+ 30 mM HPGCD	26.63	26.48	26.56	0.11	0.41
90 mg/ml DS	22.51	22.60	22.56	0.06	0.28
120 mg/ml DS	23.54	23.57	23.56	0.02	0.10
120 mg/ml DS	31.47	31.30	31.39	0.12	0.39

[0168] 透析前和24小时后制剂的pH值证实了pH变换(表8)。

[0169] 表8

[0170]

样品	pH		粘度(cP)	重量摩尔渗透压浓度(mOsmol)
	t0	t24		

[0171]

120 mg/ml 55 mM Meth+30 mM HPGCD	5.19	7.80	6.56	486
120 mg/ml 200 mM Meth+30 mM HPGCD	5.24	7.75	7.09	672
180 mg/ml 55 mM Meth+30 mM HPGCD	5.19	7.76	41.62	621
180 mg/ml 200 mM Meth+30 mM HPGCD	5.28	7.66	37.07	862
90 mg/ml 对照	5.27	7.86	2.55	321
120 mg/ml 对照	5.22	7.80	4.76	320
180 mg/ml 对照	5.28	7.77	27.21	398
组织缓冲液*	6.99			

[0172] 在前四个小时中每小时进行样品的视觉评估。结果报告在表9中。

[0173] 表9

[0174]

时间 (小时)	120 mg/ml 55 mM Meth +30 mM HPGCD	120 mg/ml 200 mM Meth +30 mM HPGCD	180 mg/ml 55 mM Meth +30 mM HPGCD	180 mg/ml 200 mM Meth +30 mM HPGCD	90 mg/ml 对照	120 mg/ml 对 照	180 mg/ml 对 照
0	无	无	无	无	无	无	无
1	轻度	极轻度	重度	中度	极轻度	轻度	中度
2	重度	中度	重度	重度	中度	中度	极重度
3	重度	重度	重度	重度	重度	重度	极重度
4	重度	重度	重度	重度	重度	重度	极重度

[0175] HPGCD和甲硫氨酸的添加改善了基本制剂的沉淀速率,特别是在高浓度的罗莫索单抗(180mg/ml)时。

[0176] 实施例4:扩展的甲硫氨酸和HPGCD筛选以及对重量摩尔渗透压浓度和粘度的影响

[0177] 制备包含含有和不含有醋酸钙的HPGCD与甲硫氨酸的组合的20种不同制剂,以研究额外浓度的甲硫氨酸和HPGCD以及其对pH、粘度和重量摩尔渗透压浓度的影响。

[0178] 使用30kDa Sartorius Viva Flow 50,台式切向流过滤(TFF)盒将50mM醋酸钠,14mM醋酸钙,6%蔗糖,0.006%聚山梨醇酯20(pH5.2)(药物溶液,DS)中的120mg/ml罗莫索单抗浓缩至~190mg/ml。使用Masterflex蠕动泵在~2.5Bar的压力,≥6倍体积交换下运行系统。

[0179] 将DS中的120mg/ml罗莫索单抗缓冲液交换至55mM醋酸钠,6%蔗糖,0.006%聚山梨醇酯20,pH5.2(不含醋酸钙)中,并使用30kDa Sartorius Viva Flow 50,台式切向流过

滤 (TFF) 盒浓缩至 $\sim 190\text{mg/ml}$ 。使用 Masterflex 蠕动泵在 $\sim 2.5\text{Bar}$ 的压力、 ≥ 6 倍体积交换下运行系统。

[0180] 根据实验设计掺入甲硫氨酸和 HPGCD (表10)。

[0181] 表10

[0182]

HPGCD mM	重量 (g)	甲硫氨酸mM	重量 (g)
30	0.0529	55	0.0098
77.5	0.1366	127.5	0.0228
125	0.2203	200	0.0358
MW	1762g/mol	MW	149.21g/mol
体积	1ml	体积	1.2ml

[0183] 使用分析天平称量产生 1.2mL 具有所需浓度的样品所需的甲硫氨酸的量。将甲硫氨酸溶于 2.2mL 适当的蛋白质溶液 (含/不含醋酸钙) 中。使用分析天平称量所需量的 HPGCD 以产生 1mL 所需浓度的样品。使用 1ml 适当的蛋白质/甲硫氨酸溶液 (含/不含醋酸钙) 溶解 HPGCD。

[0184] 通过 pH 变换模型运行样品。如上所述, 在透析前和透析后测量 pH 和浓度。还测量透析前的重量摩尔渗透压浓度和粘度, 以鉴定满足皮下施用的生理要求的特定制剂。表11显示了 20 种新设计的制剂和在该实验中运行的 6 个对照。

[0185] 表11

[0186]

制剂编号	HPGCD (mM)	Met (mM)	Ca (14 mM)	浓度 (mg/ml) 平均值	粘度 (cP)	重量摩尔 渗透压浓 度 (mOsmol)	pH	
							t0	t24
1	77.5	55	无	154.1	—	773.0	5.17	8.08
2	30	200	有	175.8	36.3	804.0	5.03	7.99
3	77.5	127.5	有	171.7	51.9	930.0	5.02	8.01
4	30	127.5	无	157.6	34.1	674.0	5.04	7.97
5	77.5	127.5	有	169.8	51.1	896.7	4.99	7.96
6	77.5	200	无	148.7	36.0	988.3	5.15	8.02
7	77.5	55	无	151.1	41.2	752.3	5.31	8.01
8	77.5	200	无	148.9	36.3	986.0	5.3	8.01
9	125	200	有	160.0	66.4	1305.5	5.25	8.08
10	30	55	有	178.4	36.5	590.3	5.32	8.05
11	77.5	127.5	有	174.0	51.8	908.3	5.2	8.00
12	30	127.5	无	160.4	27.5	654.0	5.13	8.04
13	125	55	有	167.7	73.2	1043.0	5.17	8.03
14	125	127.5	无	146.7	50.6	1149.0	5.22	8.05
15	125	127.5	无	146.8	52.4	1165.3	5.23	8.28
16	125	127.5	有	167.0	69.4	1198.0	5.18	8.04
17	77.5	55	有	177.5	53.3	819.0	5.15	8.15
18	77.5	200	有	173.5	48.6	1043.3	5.2	8.15
19	30	127.5	有	183.2	39.6	681.3	5.14	8.08
20	77.5	127.5	无	153.0	41.8	897.0	5.27	8.11
21	0	0	有	90.4	2.8	328.7	5.06	8.22
22	0	0	有	118.8	5.4	323.7	5.18	8.19
23	0	0	有	184.3	32.2	388.7	5.14	8.16
24	0	0	无	93.4	2.83	322.0	5.18	8.26
25	0	0	无	123.7		336.7	5.21	8.18
26	0	0	有	187.4	39.5	395.0	5.37	8.13

[0187] 测量透析前制剂的浓度,并示于表11的第5栏中;还测量了透析后浓度,其趋势与先前测试的制剂相似(数据未显示)。测量透析前和透析后的pH、粘度和重量摩尔渗透压浓度,并在表11中说明。

[0188] 在前五个小时中每小时进行样品的视觉评估。结果报告于表12中。

[0189] 表12

[0190]

hr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无
1	极重度	轻度	极轻度	极重度	极轻度	中度	极重度	中度	轻度	重度	轻度	极重度	中度
2	极重度	中度	中度	极重度	中度	重度	极重度	重度	中度	极重度	中度	极重度	重度
3	极重度	重度	重度	极重度	中度	重度	极重度	重度	中度	极重度	重度	极重度	重度
4	极重度	重度	重度	极重度	重度	重度	极重度	极重度	中度	极重度	极重度	极重度	极重度
5	极重度	极重度	极重度	极重度	极重度	极重度	极重度	极重度	重度	极重度	极重度	极重度	极重度
hr	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
0	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无
1	极重度	极重度	轻度	中度	中度	重度	重度	无	轻度	极重度	中度	重度	极重度
2	极重度	极重度	中度	重度	中度	极重度	极重度	轻度	中度	极重度	重度	极重度	极重度
3	极重度	极重度	中度	重度	重度	极重度	极重度	中度	重度	极重度	重度	极重度	极重度
4	极重度	极重度	重度	极重度	重度	极重度	极重度	重度	重度	极重度	重度	极重度	极重度
5	极重度	极重度	重度	极重度	极重度	极重度	极重度	重度	极重度	极重度	重度	极重度	极重度

[0191] 将所有结果输入统计分析包 (Software SAS JMP 11, 11.0.0版; 64字节)。选择4种制剂 (表13第2栏中详述的) 以就具有预测的重量摩尔渗透压浓度 ($\sim 800\text{mOsm/l}$ 至 $\sim 1000\text{mOsm/l}$) 和适合于所需药物制剂的粘度 ($< 80\text{cP}$) 进行进一步测试。

[0192] 为了制备包含HPGCD和甲硫氨酸的制剂, 需要缓冲液交换并将罗莫索单抗从 $\sim 119\text{mg/ml}$ 浓缩至 $\sim 150\text{mg/ml}$ 和至 $\sim 180\text{mg/ml}$; 在浓缩前进行6倍体积缓冲液交换。使用Solo VPE高浓度UV分光光度计测量浓度。所使用的罗莫索单抗的消光系数为 $1.50\text{ml}/(\text{mg}\cdot\text{cm})$ 。从一式两份读数测定浓度。在 5°C 下使用离心机在1小时的时段中以 3200rpm 在VivaSpin Spin 20, 30KD 离心旋转过滤器中进行缓冲液交换和浓缩。在每次旋转之间使用容积式移液管混合材料。以一式两份制备样品。20次旋转后, 加入所有6个体积的缓冲液以进行缓冲液交换。制剂B、C和D中浓度达到 $\sim 150\text{mg/ml}$ 和 $\sim 180\text{mg/ml}$ 。

[0193] 由于浓缩制剂A的问题, 决定使用毛细管来浓缩该制剂并达到 150mg/ml 的浓度, 然后达到 180mg/ml 的浓度。使用 0.22mM 注射过滤器将所有材料无菌过滤并在制备后于 5°C 下储存。将每种样品掺入相应的1%聚山梨醇酯20至浓度为 0.006% 。所有制剂均在目标浓度的 $\pm 5\%$ 范围内 (表13)。

[0194] 表13

[0195]

制剂编号	详述	需要的浓度	终浓度	预测的重量 摩尔渗透压 浓度 (mOsmol)	预测的粘 度 (cP)
A	55 mM NaACE*, 14 mM CaACE [#] , 6%蔗糖, 0.006% 聚山梨醇酯 20, 96 mM HPGCD, pH5.2	150	148.30	772.8	52.6
		180	176.87	800.4	64.6
B	55 mM NaACE*, 14 mM CaACE [#] , 6%蔗糖, 0.006% 聚山梨醇酯 20, 78 mM HPGCD, 55 mM 甲硫氨酸 pH5.2	150	152.25	773.5	42.8
		180	182.12	801.1	54.8
C	55 mM NaACE*, 14 mM CaACE [#] , 6%蔗糖, 0.006% 聚山梨醇酯 20, 55 mM HPGCD, 125 mM 甲硫氨酸 pH5.2	150	151.02	771.5	33.1
		180	186.24	799.1	45.1
D	55 mM NaACE*, 14 mM CaACE [#] , 6%蔗糖, 0.006% 聚山梨醇酯 20, 80 mM HP CD, 160 mM 甲硫氨酸 pH5.2	150	151.21	955.3	40.5
		180	183.48	982.9	52.3

[0196] *NaACE=醋酸钠;[#]CaACE=醋酸钙

[0197] 在透析后测量这些制剂的浓度,并且浓度如所预期的,遵从与先前测试的制剂相同的趋势(数据未显示)。测量每种制剂的透析前和透析后pH以及透析前的粘度和重量摩尔渗透压浓度,这些结果报告于表14中。在表14中,A150表示表12中的制剂A含有150mg/ml的罗莫索单抗,A180表示表13中的制剂A含有180mg/ml的罗莫索单抗等。对照制剂包含浓度为90mg/ml、120mg/ml、150mg/ml和180mg/ml的罗莫索单抗的55mg醋酸钠,14mM醋酸钙,6%蔗糖,0.006%聚山梨醇酯20,96mM HPGCD,pH5.2基本制剂。

[0198] 表14

[0199]

制剂	pH		粘度 (cP)	重量摩尔渗透压浓度 (mOsmol)
	t0	t24		
A 150	5.55	7.94	164.41	1680
A 180	#	8.12	#	#
B 150	5.61	8.05	133.16	748
B 180	5.57	8.02	594.17	#
C 150	5.48	7.96	83.00	747
C 180	5.65	7.99	343.54	847
D 150	5.64	7.99	162.55	853
D 180	5.71	8.03	765.78	#
对照 90	5.28	8.03	3.19	323
对照 120	5.22	7.99	6.09	326
对照 150	5.26	7.97	13.08	354
对照 180	5.26	7.99	27.2	386
组织缓冲液	7.17	7.15		

[0200] # = 没有足够的样本来测试

[0201] 总之,已经发现HPGCD与甲硫氨酸的组合在液体制剂中令人惊讶地有益于稳定抗体,特别是在高浓度下。

SEQ ID NO:11

1	Asp	D	Ile	I	Gln	Q	Met	M	Thr	T	Thr	Gln	Q	Ser	S	Pro	P	Ser	S	Ser	S	Leu	L	Ser	S	Ala	A	Ser	S	Val	V	Arg	R	Val	V	
20	Thr	T	Ile	I	Thr	T	Cys	C	Arg	R	Arg	Ala	A	Ser	S	Gln	Q	Asp	D	Ile	I	Ser	S	Asn	N	Tyr	Y	Tyr	Leu	Gln	Q	Gln	Q	Gln	Q	
38	Lys	K	Pro	P	Gly	G	Lys	K	Ala	A	Pro	Pro	Pro	Lys	K	Leu	L	Leu	L	Ile	I	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	S		
58	Val	V	Pro	P	Ser	S	Arg	R	Phe	F	Phe	Ser	S	Gly	G	Ser	S	Gly	G	Ser	S	Gly	G	Thr	Thr	Asp	Asp	Thr	Leu	Leu	Asn	Asn	Ile	Ile	Ser	Ser
77	Ser	S	Leu	L	Gln	Q	Pro	P	Glu	E	Glu	Asp	D	Phe	F	Ala	A	Thr	T	Tyr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gln	Gln	Gly	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Pro
96	Tyr	Y	Thr	T	Phe	F	Gly	G	Gly	G	Gly	Gly	G	Thr	T	Lys	K	Val	V	Glu	E	Ile	Ile	Lys	Lys	Arg	Arg	Ala	Ala	Val	Val	Pro	Pro	Ser	Ser	
115	Val	V	Phe	F	Ile	I	Phe	F	Pro	P	Pro	Pro	P	Ser	S	Asp	D	Glu	E	Gln	Q	Leu	Leu	Lys	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Val	Val	Val	Val	Val	
134	Cys	C	Leu	L	Leu	L	Asn	N	Asn	N	Asn	Phe	F	Tyr	Y	Pro	P	Arg	R	Glu	E	Ala	Ala	Lys	Lys	Val	Val	Val	Val	Trp	Trp	Asp	Asp	Asn	Asn	
153	Ala	A	Leu	L	Gln	Q	Ser	S	Gly	G	Asn	Asn	Asn	Ser	S	Gln	Q	Glu	E	Ser	S	Val	Val	Thr	Thr	Glu	Glu	Lys	Lys	Asp	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	
172	Thr	T	Tyr	Y	Ser	S	Leu	L	Ser	S	Ser	Ser	S	Thr	T	Leu	L	Thr	T	Leu	L	Ser	Ser	Gln	Gln	Ala	Ala	Asp	Asp	Tyr	Tyr	His	His	Lys	Lys	
191	Val	V	Tyr	Y	Ala	A	Cys	C	Glu	E	Glu	Gln	Q	Gln	Q	His	H	Gln	Q	Gly	G	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Pro	Val	Val	Ser	Ser	Phe	Phe	
210	Asn	N	Arg	R	Gly	G	Glu	E	Cys	C	Cys	Gly	G	Glu	E	Cys	C	Glu	E	Cys	C	Arg	Arg	Gly	Gly	Glu	Glu	Asn	Asn	Lys	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	

图1

229	Cys C	Pro P	Pro P	Cys C	Pro P	Ala A	Pro P	Pro P	Ile I	Pro P	Val V	Ala A	Gly G	Pro P	Pro P	Ser S	Val V	Phe F	Leu L	Phe F	Pro P	Pro P
248	Lys K	Pro P	Lys K	Asp D	Thr T	Leu L	Met M	Ile I	Pro P	Ser S	Arg R	Val V	Thr T	Gly G	Pro P	Glu E	Thr T	Val V	Cys C	Phe F	Pro P	Pro P
267	Asp D	Val V	Ser S	His H	Glu E	Asp D	Pro P	Glu E	Gln Q	Val V	Gln Q	Phe F	Thr T	Phe F	Asn N	Trp W	Tyr Y	Val V	Asp D	Gly G	Pro P	Pro P
286	Val V	His H	Asn N	Ala A	Lys K	Thr T	Lys K	Pro P	Arg R	Val V	Glu E	Gln Q	Glu E	Glu E	Gln Q	Phe F	Asn [*] N	Ser S	Thr T	Val V	Pro P	Pro P
305	Val V	Ser S	Val V	Leu L	Thr T	Val V	Val V	His H	Gln Q	Ala A	Pro P	Pro P	Asp D	Thr T	Leu L	Asn N	Gly G	Lys K	Glu E	Tyr Y	Pro P	Pro P
324	Lys K	Val V	Ser S	Asn N	Lys K	Gly G	Leu L	Pro P	Ala A	Gln Q	Thr T	Pro P	Asp D	Thr T	Leu L	Lys K	Thr T	Ser S	Glu E	Arg R	Pro P	Pro P
343	Gly G	Gln Q	Pro P	Arg R	Glu E	Pro P	Gln Q	Val V	Tyr Y	Thr T	Val V	Lys K	Lys K	Pro P	Pro P	Pro P	Ser S	Arg R	Glu E	Met M	Thr T	Thr T
362	Lys K	Asn N	Gln Q	Val V	Ser S	Leu L	Thr T	Cys C	Leu L	Val V	Val V	Lys K	Lys K	Gly G	Asn N	Phe F	Tyr Y	Ser S	Ser S	Asp D	Pro P	Pro P
381	Val V	Glu E	Trp W	Glu E	Gly G	Asn N	Gly G	Gln Q	Pro P	Glu E	Glu E	Asn N	Asn N	Tyr Y	Tyr Y	Tyr Y	Lys K	Thr T	Thr T	Pro P	Pro P	Met M
400	Leu L	Asp D	Ser S	Asp D	Phe F	Ser S	Phe F	Phe F	Leu L	Leu L	Leu L	Leu L	Ser S	Lys K	Lys K	Leu L	Thr T	Asp D	Asp D	Lys K	Ser S	Arg R
419	Trp W	Gln Q	Gln Q	Gly G	Phe F	Val V	Phe F	Ser S	Cys C	Ser S	Ser S	Ser S	Val V	Met M	His H	His H	Glu E	Ala A	Leu L	His H	Asn N	His H
438	Tyr Y	Thr T	Gln Q	Lys K	Ser S	Leu L	Ser S	Leu L	Leu L	Leu L	Leu L	Leu L	Gly G	Lys K	Gln Q	Thr T	Tyr Y	Pro P	Gly G	Lys K	Lys K	Lys K

32