



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114867468 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 05

(21) 申请号 202080088100.8

(22) 申请日 2020.12.10

(30) 优先权数据

CU-2019-0104 2019.12.17 CU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CU2020/050007 2020.12.10

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/121444 ES 2021.06.24

(71) 申请人 分子免疫中心

地址 古巴哈瓦那

(72) 发明人 Y·S·赫尔南德兹特莱罗

O·L·费尔南德兹塞兹

J·F·桑托托马斯珀姆帕

M·塞德诺阿利亚斯

K·拉什达德拉鲁兹赫尔南德兹

T·伯吉阿诺阿约 K·莱昂蒙松

A·卡斯蒂洛维特罗克

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 傅宇昌

(51) Int.Cl.

A61K 9/08 (2006.01)

G07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

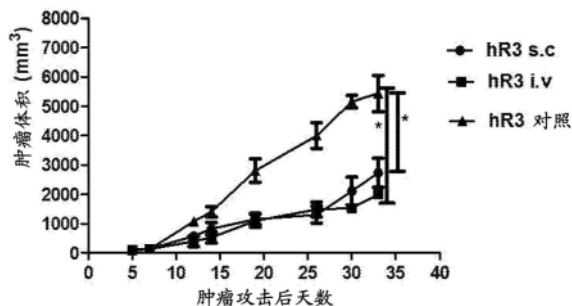
权利要求书1页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

尼妥珠单抗的稳定和高浓度制剂

(57) 摘要

本发明涉及生物技术和医学的领域,并且描述了包含处于50至200mg/mL的浓度范围的人源化单克隆抗体尼妥珠单抗的高浓度药制剂。所述溶液的低粘度值允许在治疗癌症中通过皮下或肌内途径来使用它们。这些制剂以其液体形式和冻干形式都是稳定的。



1. 单克隆抗体 (mAb) 尼妥珠单抗的高度浓缩和稳定的药制剂, 其特征在于, 所述药制剂包含:

- a) 处于100至210mg/mL的浓度范围的单克隆抗体尼妥珠单抗,
- b) 处于5至30mM的范围的缓冲物质, 其提供了 6.5 ± 0.5 的pH值,
- c) 处于0.02至0.06%的范围的表面活性剂,
- d) 处于30至150mM的范围的氨基酸或其混合物, 和
- e) 任选地, 处于2至6%的范围的作为稳定剂的碳水化合物。

2. 根据权利要求1的药制剂, 其中所述缓冲物质选自包括下列各项的组:

- 组氨酸缓冲液, 和
- 磷酸钠。

3. 根据权利要求1的药制剂, 其中所述表面活性剂选自包括下列各项的组:

- 聚山梨酯20, 和
- 聚山梨酯80。

4. 根据权利要求1的药制剂, 其中所述氨基酸选自包括下列各项的组:

- L-甲硫氨酸, 和
- 甘氨酸。

5. 根据权利要求1的药制剂, 其中所述碳水化合物为蔗糖。

6. 权利要求1-5中任一项的药制剂, 其处于其液体形式。

7. 权利要求1-5中任一项的药制剂, 其处于其冻干形式。

8. 根据权利要求6的药制剂, 其特征在于, 所述药制剂在150mg/mL的浓度下具有 ≤ 5 cP的粘度。

9. 权利要求1-8中任一项的药制剂在治疗癌症中的用途。

10. 治疗有此需要的患者的方法, 其包括通过采用1.3-2mL的注射体积通过皮下途径以200mg/70kg-400mg/70kg的剂量施用权利要求1-8中任一项的药制剂, 所述接种可以分配在一个或多个注射位点处。

11. 治疗有此需要的患者的方法, 其包括通过采用1.3-5mL的注射体积通过肌内途径以150mg/70kg-1000mg/70kg的剂量施用权利要求1-8中任一项的药制剂。

尼妥珠单抗的稳定和高浓度制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术和医学的领域,尤其是涉及获得人源化单克隆抗体尼妥珠单抗的高度浓缩和稳定的制剂,其用于在治疗癌症中通过皮下(SC)或肌内(IM)途径进行施用。

[0002] 发明背景

[0003] 识别人表皮生长因子受体Her1的人源化单克隆抗体(mAb)尼妥珠单抗为IgG1同种型,并且通过克隆小鼠mAb ior egf/r3的高变区以及人来源的重链和轻链的恒定区和可变区的构架(分别地,REI和NEWN)的DNA来获得(Mateo,C.等人,(1997),*Immunotechnology* 3:71-81)。尼妥珠单抗的功效已在临床试验中,在具有头颈肿瘤(Crombet,T.等人,(2004)*J Clin Oncol.*22:1646-1654)、神经胶质瘤(Ramos,T.等人,(2006)*Cancer Biol Ther.*5:375-379;MacDonald,T.等人,(2011)*Neuro Oncol.*13:1049-1058)和食管肿瘤(Ramos-Suzarte,M.等人,(2012)*Cancer Biology&Therapy* 13:600-605)的患者中得到证实。该抗体(Ab)处于关于鼻咽癌、局部晚期食管癌和鳞状细胞食管癌的III期临床试验中(Galluzzi,L.等人,(2012)*OncoImmunology.*1:28-37)。

[0004] 单克隆抗体尼妥珠单抗的施用通过静脉内(IV)输注来进行,其中使用其中所述抗体处于5mg/mL的浓度的液体制剂(<https://www.cecmecmed.cu/registro/rcp/cimahernimotuzumab>)。该施用通过将四个小瓶的5mg/mL的尼妥珠单抗溶解在一袋0.9%的NaCl溶液中进行。尼妥珠单抗的商业制剂的组成还包含15mM和pH为大约7的磷酸钠缓冲液、150mM的氯化钠和0.02%的聚山梨酯80(*Revista Cubana de Farmacia.*2012,46(3):379-380)。在临床中尼妥珠单抗以200mg(在胰腺癌中,400mg)的剂量每周一次进行施加,持续六周,伴随有放射疗法和化学疗法。然后,每15天施用200mg的维持剂量,直至患者允许。因此,重要的是拥有有助于尼妥珠单抗的这种长期使用的施用途径,而无需患者必须去医院机构。

[0005] 如已知的那样,IV施用带来一些缺点,例如长的施用时间段,对于其施用需要有资格的人员,有感染风险,和反应剧烈(Michael F.Haller(2007)*Pharmaceutical Technology*,31(10):118-132)。

[0006] 鉴于此,世界范围的倾向是朝着所述mAb的SC施用(Viola M,Sequeira J等人,(2018)*J Control Release*;286:301-314),其作为优点具有施用时间和体积减少、感染风险降低和甚至由患者本人自行施用,因为操作和施用具有所需要的量的单一小瓶是更容易的(Haller M.F.(2007)*Pharmaceutical Technology*,31(10):118-132)。另一方面,药物的IM施用具有相对于IV而言的优点,例如更低的治疗费用和更少的加强监护。此外,IM途径具有比IV途径更小的感染风险和更短的施用时间。另外,已知IM途径较少出现副作用和超剂量。还应当注意,IM途径的吸收和生物利用率是足够高的并且非常接近IV(Jing-fen Jin等人,*Patient Preference and Adherence*,2015,9:923-942)。

[0007] 在目前在临床中以SC制剂进行使用的抗体之中包括曲妥珠单抗(US 9,345,661)和利妥昔单抗(US 10,280,227),在这两种制剂中都使用了透明质酸酶以便实现以良好的

抗体生物分布注射超过1.5mL的体积,并且达到对于取得治疗效应来说必需的剂量(Shpilberg, O.和C.Jackisch. (2013) British Journal of Cancer. 109:1556-1561)。

[0008] 使用透明质酸酶的另一高度浓缩的制剂为在专利申请CN107898756A中所描述的那种。在该专利申请中,要求保护用于SC或IM使用的高浓度的尼妥珠单抗的制剂。根据在该专利中所报道的,在该制剂中需要存在透明质酸酶以便具有适当的渗透性。

[0009] 存在关于针对表皮生长因子的抗体的高度浓缩的制剂的先前报道,如在专利申请W02011080209中所描述的,其中要求保护包含抗-EGFR抗体的通过超滤获得的高浓度液体制剂。所述专利申请尽管提出了所要求保护的制剂可以被用于尼妥珠单抗,但是在实际结果中没有显示确保了这样的断言。该专利申请要求保护从1mg/ml至200mg/ml的抗体浓度,然而仅证实了抗体hu-ICR62的直至50mg/ml的浓度。此外,在该专利申请中所要求保护的赋形剂和浓度的范围是极为宽广的,因为它们实际上包括了所有的在现有技术中最常使用的赋形剂和浓度。在本发明中,证实了在W02011080209中所要求保护的范围内所包括的一些赋形剂和浓度的组合对于尼妥珠单抗来说不是最稳定的,也不是最好的制剂选择。

[0010] 作为通过IM途径进行施用的抗体的主要例子是帕利珠单抗。该抗体作为冻干制剂存在,其在水中进行重构后具有100mg/mL的帕利珠单抗,此外还有赋形剂例如组氨酸、甘氨酸和甘露醇,并且在治疗呼吸道合胞病毒中以15mg/kg的剂量进行使用。

[0011] 在单一制剂中实现抗体保持稳定性、低浊度和粘度是一项需要适当的筛选方法的挑战。找到适合于抗体在高浓度下满足上述要求的赋形剂和条件的组合不是微不足道的,因为迄今为止还无法事先预测对于特定的抗体来说哪种组合是有效的,因为每一种抗体是不同的并且在主要降解机制方面表现不同(Manning M.C.等人,(2018) Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 112:1-59; Viola M, Sequeira J等人,(2018) J Control Release, 286:301-314)。

[0012] 本发明的发明人找到了与已经报道的那些不同并且具有特定的赋形剂组合的用于尼妥珠单抗的制剂,其保证了其稳定性、低浊度和低粘度,此外通过放弃适合于SC制剂的情况的用于保证稳定性和渗透性的透明质酸酶而变得更简单。用这些特定的制剂,还达到了100至180mg/mL的尼妥珠单抗的浓度,如此使得能够增加抗体的剂量而不增加施用体积。这些制剂通过SC或IM途径的使用有助于其在当需要以200mg至360mg(对于SC途径)和200-720mg(对于IM)的剂量进行长期施用时使用,优点是可以由患者自行施用。

[0013] 发明简述

[0014] 在一个实施方案中,本发明的目标为单克隆抗体尼妥珠单抗的高度浓缩和稳定的药学制剂,其包含:处于100至210mg/mL的浓度范围单克隆抗体尼妥珠单抗;处于5至30mM的范围的缓冲物质,其提供了 6.5 ± 0.5 的pH值;处于0.02至0.06%的范围的表面活性剂;处于30至150mM的范围的氨基酸或其混合物;和任选地,处于2至6%的范围的作为稳定剂的碳水化合物。

[0015] 特别地,所述制剂的缓冲物质选自组氨酸缓冲液和磷酸钠。所述表面活性剂选自聚山梨酯20和聚山梨酯80。所述氨基酸选自L-甲硫氨酸和甘氨酸。在该制剂中所使用的碳水化合物为蔗糖。

[0016] 更特别地,上述制剂可以处于液体或冻干形式。处于150mg/mL的浓度的液体制剂具有 ≤ 5 cP的粘度。

[0017] 此外,本发明的目标为上面所描述的药制剂在治疗癌症中的用途。特别地,描述了治疗有此需要的患者的方法,其包括通过SC途径或通过IM途径以200mg/70kg-750mg/70kg的剂量施用在本发明中所描述的药制剂。通过使用1.3-2mL的注射体积和150至200mg/mL的浓度来实现该抗体的SC施用。此外,当需要更高的抗体剂量时,可该接种可以分配在一个或多个注射位点处。在IM途径的情况下,对于150mg/mL的浓度和200至750mg/70kg的剂量,注射体积从1.3至5mL变动。在使用200mg/mL的浓度和1.3-5mL的肌肉体积的情况下,达到260-1000mg/70kg的剂量。

[0018] 发明详述

[0019] 单克隆抗体尼妥珠单抗的高浓度稳定制剂的获得

[0020] 本发明涉及单克隆抗体尼妥珠单抗(在本文中我们也将其称为hR3)的高浓度制剂。在本发明中所描述的制剂中的尼妥珠单抗浓度在100至210mg/mL,优选地100至180mg/mL的范围内。在本申请中所描述的尼妥珠单抗制剂包含缓冲物质、表面活性剂、氨基酸和任选地碳水化合物。所述缓冲物质可以为组氨酸缓冲液或磷酸钠,两者都在5至30mM的范围内,这使得将该制剂的pH保持在 6.5 ± 0.5 的pH范围内成为可能。本发明的制剂可以包含处于0.02至0.06%的浓度范围的聚山梨酯20或聚山梨酯80作为表面活性剂。所述碳水化合物可以为具有2至6%的浓度的蔗糖和海藻糖。另外,所述氨基酸选自处于30至150mM的浓度范围的L-甲硫氨酸或甘氨酸或者两者。

[0021] 为了获得这些制剂,可以采用具有孔大小为30-50kD的纤维素膜的Amicon Ultra型超滤-渗滤(UF/DF)系统。为了渗滤或浓缩样品,可以在2-8°C的温度下采用在900-1100g的范围内的离心速度。使样品经历无菌过滤,其中将会取决于样品的体积来选择待使用的过滤器的类型。以其可以制备在本发明中所描述的制剂的另一种方式为通过实验室或中试规模的切向流过滤系统。为此,可以使用具有30和50kD的孔的膜。用于实现缓冲液更换的样品的渗滤通过使用10-15个渗滤体积(diavolume)的最终缓冲液来进行。为了浓缩样品,应当将初始体积减小至小于相应于所希望的浓度的计算出的体积的体积。

[0022] 这些制剂可以通过分阶段筛选策略来获得,其中首先选择最佳的缓冲液和pH值。接着是为该制剂选择最佳的盐、表面活性剂和碳水化合物的第二阶段,以及随后为该制剂选择最佳的氨基酸的第三阶段。待采用的另一种变化形式可以是通过同时筛选,其中按照析因设计使用不同类型的赋形剂以及其不同的组合。在该情况下,在同一制剂中具有在多于2或3种赋形剂之间的相互作用的可能性。

[0023] 本发明的另一个方面考虑了上面所描述的制剂的冻干和其以后的重构,以及用于制备等渗和稳定的重构制剂的方法。所述方法包括在上面所描述的缓冲液中重构抗体和稳定剂的冻干混合物,从而使得在重构制剂中的抗体浓度为至少100mg/mL并且最大210mg/mL,即3-5倍于在冻干前在混合物中的抗体浓度。

[0024] 尼妥珠单抗的高浓度制剂的稳定性的测定

[0025] 为了验证最稳定的制剂变体以及每种赋形剂对于稳定性的影响,通过动态光散射(DLS)来进行稳定性预测参数的研究。这些参数为扩散相互作用参数(kD)、Z电势和聚集温度(Tagg)。kD的测定通过对于从12mg/mL至2mg/mL的尼妥珠单抗浓度曲线测量扩散系数来进行。Tagg从初始样品开始并且用从25至76°C的温度斜坡来进行测定,和Z电势通过测量处于初始浓度的样品来进行测定。

[0026] 用于确定最佳的制剂的另一种方法为胁迫研究,其中使样品在恒温浴中经历50℃的温度10至20天的时间,然后在不同的时间间隔处通过物理化学和生物学测定来进行分析。

[0027] 在这些测量中包括通过在340至450nm的UV光谱内的样品的吸光度的浊度测量,这使得能够检测大尺寸聚集体的形成。通过DLS的颗粒大小的测定(其中在其初始浓度下测量未稀释的完整样品)的目标是检测在溶液中聚集体或颗粒的形成。对于高浓度样品进行粘度测量,其中使用在标称100-500nm的范围内的,优选地标称200nm的关于DLS的大小标准。

[0028] 对样品还通过SDS-PAGE进行分析,以测定在胁迫期间片段的形成。在该情况下,使用非还原条件,其中用7.5%的凝胶和考马斯蓝或硝酸银染色。此外,通过高分辨率分子排阻色谱法(SEC-HPLC)来进行单体纯度的测定。

[0029] 抗体的生物学活性决定了相对于尼妥珠单抗的参考材料而言的相对效力,并且可以通过流式细胞术或者通过在表达人Her1的细胞系中细胞增殖的抑制来进行。

[0030] 治疗方法

[0031] 本发明的目标制剂可以应用于治疗具有头颈肿瘤、神经胶质瘤、食管肿瘤、肺肿瘤和胰腺肿瘤的患者。对于其治疗用途,应当独立地或者与用于治疗癌症的常规疗法(例如,放射疗法或化学疗法)相组合地向携带疾病的受试者施用所述制剂,以加强其治疗作用。

[0032] 这些制剂的施用通过SC或IM途径来进行。在SC途径的情况下,对于200mg/70kg的剂量采用1.33mL的最小样品体积。对于更大的剂量,可以增加注射体积直至2mL并且达到300/70kg的剂量。在需要大于300mg/70kg的剂量的情况下,可以采用大于150mg/mL的抗体浓度或者使用两个注射位点,这些位点可以是三角肌区、腹部区和大腿前区中的任一个,但不限于这些。例如,对于在大多数治疗中使用的每周200mg的剂量,仅用134mg/mL的尼妥珠单抗浓度就足以用于进行治疗。在更高剂量的情况下,可以采用直至210mg/mL的更高的尼妥珠单抗浓度。对于用400mg的剂量治疗胰腺癌,采用两个注射位点。

[0033] 根据在文献中所报道的,所允许的最大IM施用体积为5mL,因此当采用该施用途径时,对于150mg/mL的浓度和200至750mg的剂量,注射体积可以在1.3-5mL之间变动。当采用200mg/mL的浓度时,剂量可以达到直至1000mg。

[0034] 本发明将会用下面的实施例和附图来进一步进行阐述。但是,这些实施例不应当被解释为对本发明的范围的限制。

[0035] 附图简述

[0036] 图1:通过DLS测定的关于mAb hR3制剂变体的kD值。

[0037] 图2:通过DLS测定的关于不同的存在有氨基酸的mAb hR3制剂的kD值。

[0038] 图3:通过DLS测定的存在有氨基酸的mAb hR3制剂的颗粒大小的图。

[0039] 图4:通过DLS测量的关于处于150mg/mL的并且在4℃下储存3个月的mAb hR3制剂的颗粒大小。

[0040] 图5:通过DLS测量的处于150mg/mL的并且在4℃下储存3个月的mAb hR3制剂的粘度。

[0041] 图6:通过SEC-HPLC测量的处于150mg/mL的并且在4℃下储存3个月的mAb hR3制剂的单体纯度。

[0042] 图7:在无胸腺Balb/c小鼠中以50mg/kg的剂量通过IV和SC途径施用的单克隆抗体

尼妥珠单抗的抗肿瘤效应。

实施例

[0043] 实施例1.用于单克隆抗体尼妥珠单抗的制剂的赋形剂的筛选

[0044] 按照在表1中所显示的,从4因素和1/2分式的析因设计开始来制备9种制剂变体,变体hR3sol9相应于原始的mAb hR3制剂。在制备后,将溶液通过0.2 μ m的过滤器进行过滤并且储存于4 $^{\circ}$ C。

[0045] 表1.在赋形剂筛选中不同的mAb hR3制剂变体的组成

不同的 mAb hR3 制剂的组成									
	hR3 sol1	hR3 sol2	hR3 sol3	hR3 sol4	hR3 sol5	hR3 sol6	hR3 sol7	hR3 sol8	hR3 sol9
	+	-	+	-	+	-	+	-	15 mM 磷酸钠 缓冲液, pH 7
	-	+	-	+	-	+	-	+	-
[0046]	+	+	-	-	-	+	+	-	150 mM 的 NaCl
	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	-	-	+	+	-	+	+	-	-
	+	-	-	+	+	+	-	-	-
	-	+	+	-	-	-	+	+	0.02%的聚山 梨酯 80
(+) : 在所述制剂中存在所述赋形剂 (-) : 在所述制剂中不存在所述赋形剂									

[0047] 一旦制备了溶液,就在具有50kD孔大小、再生纤维素膜和15mL体积的Amicon Ultra管中通过UF/DF来进行缓冲液更换。将样品在4 $^{\circ}$ C的温度下以936g进行离心。作为起始产物,使用在15mM磷酸钠、150mM氯化钠和0.2mg/mL的Tween 80的缓冲溶液(pH 7)中的mAb hR3。在制备了具有10mg/mL的抗体浓度的制剂后,通过DLS进行扩散相互作用参数(kD)的测量。

[0048] 在图1中可以观察到,具有更高的kD值并因此具有更有利于稳定性的蛋白质-蛋白质相互作用和更小的聚集倾向的变体为变体hR3sol8和hR3sol3,随后为变体hR3sol4,这表明了所述碳水化合物在该制剂中的稳定效应。此外,该结果的另一个观察是,关于变体hR3sol8的kD值远高于关于变体hR3sol3的kD值,这暗示组氨酸和蔗糖的组合比磷酸盐与海藻糖的组合在稳定性方面是更有利的。在最佳的变体中没有一个有NaCl的存在,因此这意味着它不利于mAb hR3的稳定性。

[0049] 为了验证最有利于稳定性的变体而进行的另一个实验是在14天期间在50 $^{\circ}$ C下的胁迫。通过SEC-HPLC来分析在经历了胁迫后的样品以测定单体纯度。在表2中观察到,具有较高单体纯度的变体为hR3sol8和hR3sol3,这与这与kD的结果相一致。具有较低单体纯度的变体为hR3sol9和hR3sol2,它们在其组成中具有氯化钠,这再一次显示了该赋形剂对于稳定性的负面效应而缓冲液的类型没有影响。

[0050] 表2. 在经历了在14天期间在50℃下的胁迫后关于mAb hR3制剂的通过SEC-HPLC的单体纯度值

通过 SEC-HPLC 的单体纯度 (经标准化的峰高)									
时间(天)	hR3 sol1	hR3 sol2	hR3 sol3	hR3 sol4	hR3 sol5	hR3 sol6	hR3 sol7	hR3 sol8	hR3 sol9
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	78.19	71.85	85.99	87.66	83.55	74.94	83.16	91.71	72.12
8	66.40	55.63	79.65	80.62	74.71	63.82	75.53	81.02	55.40
11	61.54	47.59	73.38	75.04	67.46	53.14	66.74	75.19	45.46
14	54.38	38.50	68.89	64.01	61.99	49.19	61.60	71.73	39.31

[0052] 基于上面的结果得出结论:最稳定的mAb hR3制剂变体为在其组成中在氯化钠不存在下具有某一碳水化合物例如蔗糖和海藻糖的那些。此外,蔗糖与组氨酸的组合比磷酸盐与海藻糖的组合更有利于稳定性得多。

[0053] 实施例2. 用于mAb hR3制剂的氨基酸的筛选

[0054] 来自赋形剂筛选的两种最佳变体开始制备不同的溶液,并且向每种溶液添加氨基酸(L-精氨酸、L-甲硫氨酸、甘氨酸)。制备方法与实施例1的赋形剂筛选相似。在表3中显示了包含不同氨基酸的mAb hR3制剂变体。

[0055] 表3. 存在有氨基酸的不同的mAb hR3制剂的组成

不同的 mAb hR3 制剂的组成									
	hR3 sol30	hR3 sol31	hR3 sol32	hR3 sol33	hR3 sol80	hR3 sol81	hR3 sol82	hR3 sol83	hR3 sol90
15 mM 磷酸钠缓冲液, pH 6	+	+	+	+	-	-	-	-	15 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7
15 mM 组氨酸缓冲液, pH 6	-	-	-	-	+	+	+	+	-
75 mM 的 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	150 mM 的 NaCl
5%蔗糖	-	-	-	-	+	+	+	+	-
5%海藻糖	+	+	+	+	-	-	-	-	-
0.05%的聚山梨酯 80	+	+	+	+	+	+	+	+	0.02%的聚山梨酯 80
50 mM L-精氨酸	-	+	-	-	-	+	-	-	-
50 mM L-甲硫氨酸	-	-	+	-	-	-	+	-	-
50 mM 甘氨酸	-	-	-	+	-	-	-	+	-
(+) : 在所述制剂中存在所述赋形剂 (-) : 在所述制剂中不存在所述赋形剂									

[0057] 通过DLS进行kD的测量,其结果显示在图2中。在该图中可以观察到,具有较大kD值的变体为hR3sol80、hR3sol81、hR3sol82和hR3sol32;其中最稳定的为具有组氨酸缓冲液的那些。还值得注意的是,对于所述两种缓冲液,甲硫氨酸的存在均产生高的kD值,这在用其他氨基酸的情况下不发生。

[0058] 使不同的制剂在恒温浴中经历50℃的胁迫15天,并且在第0、5、12和15天通过DLS来测量颗粒直径。图3显示了这些测量的结果。可以看到,具有较小颗粒直径并因此具有较少聚集的变体为变体hR3sol180、hR3sol182和hR3sol183。这确证了前面所看到的,其中具有组氨酸缓冲液的制剂比具有磷酸盐缓冲液的制剂更稳定,以及具有L-甲硫氨酸或甘氨酸的变体比具有L-精氨酸的变体更稳定。

[0059] 另外,在表4中显示了经历了50℃的胁迫的制剂的单体纯度值。表4. 在50℃下的胁迫后关于存在有氨基酸的5mg/mL的mAb hR3制剂的通过SEC-HPLC测定的经标准化的单体纯度值

通过 SEC-HPLC 的单体纯度 (经标准化的峰高)									
时间 (天)	hR3 sol130	hR3 sol131	hR3 sol132	hR3 sol133	hR3 sol180	hR3 sol181	hR3 sol182	hR3 sol183	hR3 sol190
[0060] 0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	78.72	74.91	78.61	79.89	87.19	71.19	86.19	82.17	64.65
12	65.04	57.99	63.05	63.44	73.92	52.75	76.19	60.53	51.20
15	58.89	52.11	58.60	61.16	65.05	44.68	72.28	49.17	39.72

[0061] 表4显示,在胁迫后具有较高单体纯度的变体为hR3sol182,随后为hR3sol180。这表明,具有组氨酸缓冲液的变体比具有磷酸盐缓冲液的变体更稳定。还暗示,甲硫氨酸的存在相对于没有氨基酸的制剂而言改善了稳定性。相反地,具有较低纯度的制剂为hR3sol181和hR3sol190。这暗示,在mAb hR3制剂中L-精氨酸和氯化钠均存在去稳定效应。根据前面的结果,具有处于pH 6的组氨酸缓冲液、蔗糖、聚山梨酯80和L-甲硫氨酸的mAb hR3制剂是最稳定的。

[0062] 这些结果确证,变体hR3sol12、hR3sol16、hR3sol131、hR3sol181和hR3sol190(其包括在由专利W02011080209所要求保护的组合的范围之内)并不值得推荐用于尼妥珠单抗,这是由于其低的稳定性,这影响它们在患者中的功效和安全性。上述内容巩固了在文献中所报道的概念,即由于每种蛋白质的结构差异,对于一种蛋白质来说稳定的制剂并不必然对于另一种蛋白质来说是稳定的。

[0063] 实施例3. 在4℃下高浓度mAb hR3的架存稳定性的研究

[0064] 进行在4℃下储存的具有150mg/mL的抗体的变体hR3sol180、hR3sol182和hR3sol190的稳定性的表征。在0和3个月时,对于样品进行颗粒直径和粘度(通过DLS)以及单体纯度(通过HPLC)的物理化学分析。

[0065] 在图4中显示了对于不同的变体通过DLS所获得的颗粒直径。在图中观察到,在每一种所述制剂中,直径在3个月期间保持不变,这表明在所述高浓度样品中未发生聚集。但是,值得注意的是,从初始时间起,关于变体hR3sol190的颗粒直径为大约25nm,这大于其他制剂的颗粒直径。这暗示了相对于变体hR3sol180和hR3sol182而言,在该变体中更大的分子间自联合的倾向。

[0066] 在图5中显示了用200nm的颗粒大小标准通过DLS测量的粘度值。在所有情况下,粘度都具有非常小的变化,这表明在该特性方面没有聚集或自联合效应。此外,非常重要的是注意,所有值都低于5cP,这相当远离为了适当的可注射性和可制造性而建立的极限(Li Li, Sandeep Kumar等人, Pharm Res (2014) 31:3161-3178)。此外,在150mg/mL的浓度下,粘

度值小于其他抗体的粘度值。

[0067] 在图6中显示了通过SEC-HPLC的单体纯度的图,按照所观察的,单体纯度没有重大变化,并且因此暗示150mg/mL的mAb hR3制剂在4°C下储存是稳定的。

[0068] 另外,在0和3个月之时进行没有胁迫的150mg/mL的mAb hR3制剂的生物学活性的测定。通过mAb hR3对于人表皮生长因子受体Her1的识别(借助于流式细胞术)或者通过细胞增殖的抑制来测量生物学活性。对于流式细胞术测定法,采用 2×10^5 个H292细胞/孔并且制作以1/3稀释度从81 μ g/mL开始的浓度曲线,以用于以后测定平均荧光强度(MFI)。从MFI开始测定EC50并且与商业hR3参考材料进行比较以获得相对效力。增殖抑制测定法用H292细胞并且使用WST-1作为染料来进行。将获得的吸光度与商业hR3参考材料进行比较以测定相对效力。关于时间0的两次测量的结果显示在表5中,而在该研究经过了3个月之时的结果显示在表6中。

[0069] 表5. 没有胁迫的150mg/mL的浓缩的mAb hR3制剂的生物学活性

在 t0 时 150 mg/mL 的 mAb hR3 的生物学活性					
样品	识别, 通过细胞术 (%)	细胞术 (MFI)		增殖抑制	
	3 μ g/mL	RP 细胞术	CI	RP 抑制	CI
[0070] hR3sol80 t0	99.11	81	73-89	101	91-113
hR3sol82 t0	99.04	83	78-89	104	78-139
hR3sol90 t0	99.11	79	74-84	93	59-147
RP: 相对于商业 mAb hR3 参考而言的以%表示的相对效力					
CI: 置信区间					

[0071] 在表5中观察到,通过流式细胞术测定法,关于变体hR3sol180、hR3sol182和hR3sol190的相对效力在79和83%之间,这表明即使在高浓度下也保持了其生物学活性。另一方面,通过抑制测定法的效力值在93和104%之间,这确证了细胞术的结果并且表明高浓度样品保留了其生物学活性。应当考虑到,由于在所述两个测定法中实验的内在可变性,每个值具有置信区间。

[0072] 表6. 在4°C下具有3个月的稳定性的150mg/mL的hR3制剂的生物学活性

样品	识别, 通过细胞术 (%)	识别, 细胞术 (MFI)		增殖抑制	
	3 μ g/mL	RP 细胞术	CI	RP 抑制	CI
[0073] hR3Sol 80 3M	93.93	81	56 - 117	77	66 - 89
hR3Sol 82 3M	87.85	46	42 - 49	45	35 - 57
[0074] hR3Sol 90 3M	93.76	78	72 - 84	86	69 - 107
RP: 相对于商业 mAb hR3 参考而言的以%表示的相对效力					
CI: 置信区间					

[0075] 在表6中观察到关于在4°C下具有3个月的稳定性的150mg/mL的hR3样品的生物学

活性。在此可以注意,具有较高的相对效力值的样品为hR3sol180和hR3sol190,其中对于通过细胞术的识别,值为78至81%,和对于增殖抑制,值为77至86%。

[0076] 实施例4.150mg/mL的mAb hR3制剂的最佳变体的在50℃下的胁迫的研究

[0077] 在制剂变体hR3sol180、hR3sol182和hR3sol190中,在具有50kD孔大小、再生纤维素膜和15mL体积的Amicon Ultra管中通过UF/DF将hR3浓缩至150mg/mL。将样品在4℃的温度下以936g进行离心。一旦达到150mg/mL的浓度,就将样品用0.2μm的过滤器进行过滤并且放置于50℃的恒温水浴中。在第0、4、10和15天制作不同制剂的样品以测量物理化学参数。在表7中显示了在不同取样日的单体纯度的测量结果。

[0078] 表7. 在15天期间在50℃的胁迫下,150mg/mL的mAb hR3制剂的经标准化的单体纯度值

通过 SEC-HPLC 的处于 150 mg/mL 和 50℃ 的 hR3 的单体纯度 (经标准化的峰高)			
时间 (天)	hR3sol180conc	hR3sol182conc	hR3sol190conc
[0079] 0	100.00	100.00	100.00
4	45.34	58.99	白色沉淀物
10	黄色凝胶	43.94	白色沉淀物
15	黄色凝胶	黄色凝胶	白色沉淀物

[0080] 如在表7中所观察到的,在胁迫4天之时,变体hR3sol190已完全沉淀,从而形成了白色固体,而变体hR3sol180具有45.3%的单体纯度和变体hR3sol182具有58.9%的单体纯度。上述内容表明,在高浓度下最稳定的制剂为hR3sol182,而最不稳定的为hR3sol190。该结果与在低浓度下获得的结果相一致。在胁迫10天之时,变体hR3sol180形成黄色的凝胶,而变体hR3sol182继续为溶液,其具有43.9%的单体纯度。在15天时的取样中,变体hR3sol182也形成了黄色凝胶。上面的结果表明,在组成中具有L-甲硫氨酸的制剂hR3sol182比缺乏该氨基酸的变体在高浓度下更稳定。这些结果暗示,长期而言,最稳定的制剂将会是hR3sol180和hR3sol182,与制剂hR3sol190不同。

[0081] 表8显示了没有胁迫的150mg/mL的样品的单体和二聚体的百分比。

[0082] 表8. 没有胁迫的150mg/mL的mAb hR3制剂的单体纯度

在 t0 时通过 SEC-HPLC 的 150 mg/mL 的 hR3 的纯度 (%)			
分子种类	hR3sol180conc	hR3sol182conc	hR3sol190conc
[0083] 单体	93.03	94.11	92.02
二聚体	6.30	5.29	7.17
聚集体	0.56	0.45	0.79
片段	0.099	0.015	0.010

[0084] 在此注意到,制剂hR3sol182是具有最高的单体百分比(94.1%)的制剂和具有最低的二聚体(5.2%)的制剂,这证实了该制剂降低分子间联合从而有利于稳定性的倾向。就其而言,变体hR3sol180和hR3sol190分别具有93.0%和92.0%的单体。

[0085] 还在经历50℃的胁迫之前,用为了这些测定在实施例3中所采用的相同方法,通过流式细胞术和通过细胞增殖的抑制测定了150mg/mL的mAb hR3制剂的生物学活性。这些结

果与在表5中所显示的那些相一致。

[0086] 实施例5.关于在Ba1b/c小鼠中以不同剂量通过SC途径施用的单克隆抗体尼妥珠单抗的生物利用率

[0087] 假设采用相同的抗体、相同的施用途径并且制剂的组分变化不显著地影响抗体的药物代谢动力学行为,用变体hR3so190进行生物利用率的研究。为了进行该研究,选取体重为大约20g的雌性Ba1b/c小鼠并且分为4个组,对其以25、50、100和200mg/kg体重的剂量通过SC途径施用制剂hR3so190。在施用之前,用I¹²⁵标记所述抗体。然后抽取每个个体的血液并且测量放射性活性,其与血液中抗体的浓度成正比。在表9中显示了相比于25mg/kg的IV剂量而言的关于不同剂量的生物利用率值。为了计算生物利用率(F),使用下面的公式:

$$[0088] \quad F = (Asc/Aiv) * (Div/Dsc)$$

[0089] 其中:

[0090] Asc:SC途径的曲线下面积

[0091] Aiv:IV途径的曲线下面积

[0092] Div:IV剂量

[0093] Dsc:SC剂量。

[0094] 对于IV途径,生物利用率被认为是100%。

[0095] 表9.关于以不同剂量通过SC途径施用的单克隆抗体尼妥珠单抗的生物利用率

关于通过 SC 途径的单克隆抗体尼妥珠单抗的基于从 0 至无限的曲线下面积的绝对生物利用率				
所施用的体积 (mL)	所施用的总 质量 (mg)	SC 剂量 (mg/kg)	0-∞的曲线下面积 (µg/ml*h)	生物利用率 (%)
0.2	0.5	25	15153	83.7
0.2	1.0	50	30813	87.2
0.2	2.0	100	54264	78.7
0.2	4.0	200	124280	88.0
IV 剂量 = 25 mg/kg				

[0097] 表9所显示的结果表明,在所有情况下生物利用率都高于75%,这对于该类型的施用途径来说是好的。应当观察到,尽管生物利用率实际上未随剂量增加而增加,但是抗体总质量和曲线下面积却增加了。例如,如果将这些结果外推至人,对于100mg/kg的SC剂量的情况,尽管生物利用率为78.7%,但是到达血流的抗体总质量将会是630mg,超过200mg的值(其是在临床中所使用的剂量)的三倍。

[0098] 实施例6.在无胸腺Ba1b/c小鼠中以50mg/kg的剂量通过IV途径和SC途径施用的单克隆抗体尼妥珠单抗的抗肿瘤效应

[0099] 将具有大约20g体重的雌性无胸腺Ba1b/c小鼠分为三个组,每组五只动物。所有组都在第0天以及在第10、12、14和16天接受 2×10^6 个A431细胞。向第1组通过SC途径施用1mg总质量的制剂hR3so190,第2组通过IV途径接受1mg总质量的单克隆抗体尼妥珠单抗,和第3组为对照并且接受磷酸盐缓冲盐水。

[0100] 图7显示,关于通过SC途径施用了尼妥珠单抗的小鼠的肿瘤体积与IV途径的相似。这证实,通过这两条途径的治疗功效没有差异,尽管每条途径的吸收速度和药物代谢动力

学特征是不同的。另一方面,对照组具有高得多的肿瘤生长,甚至具有显著差异。这表明了通过SC途径施用单克隆抗体尼妥珠单抗的功效。

[0101] 实施例7.150mg/mL的经冻干的单克隆抗体尼妥珠单抗的纯度

[0102] 以150mg/mL和500 μ L的体积冻干制剂hR3sol180、hR3sol182和hR3sol190。为此,在-30 $^{\circ}$ C的温度下采用实验室冻干器并且抽真空30小时直至留下白色的粉末。然后,用500 μ l的超纯水进行重构直至初始浓度,从而留下透明的且无颗粒的溶液。

[0103] 在表10中呈现了在冻干并然后重构后单克隆抗体尼妥珠单抗的不同制剂的纯度数据。

[0104] 表10.150mg/mL的经冻干和重构的单克隆抗体尼妥珠单抗的纯度

150 mg/mL 的在冻干和重构后的单克隆抗体尼妥珠单抗的纯度			
样品	单体 (%)	二聚体 (%)	单体 + 二聚体 (%)
[0105] hR3sol80	94.18	5.73	99.91
hR3sol82	98.8	1.17	99.97
hR3sol190	93.65	5.89	99.54

[0106] 可以观察到,在冻干和重构后,制剂hR3sol182具有超过98%的单体纯度,而变体hR3sol180具有大约94%的单体纯度并且变体hR3sol190具有超过93%的单体纯度。还应当注意,二聚体百分比如何依赖于制剂类型而变化。另外,在该表中显示了这些经冻干和重构的制剂的单体加上二聚体的总纯度,其在所有情况下都高于99%,这表明单克隆抗体尼妥珠单抗未丧失其稳定性,尽管在冻干过程中经历了胁迫。还应当理解,由于该抗体的自身特征,尼妥珠单抗具有单体和二聚体之间的平衡,这可以依赖于在溶液中的相互作用类型而变化。

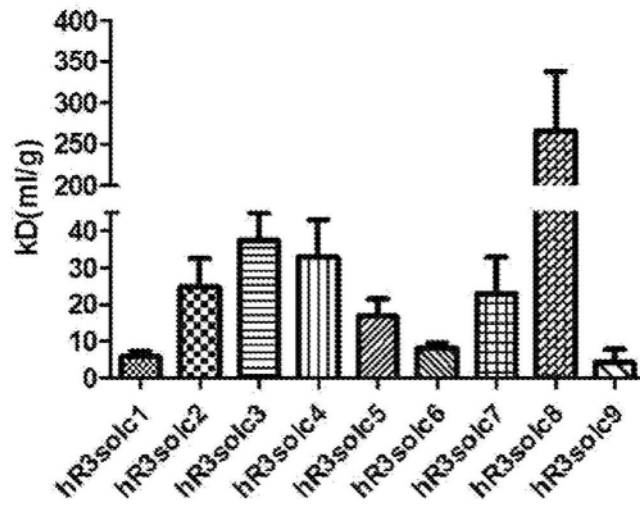


图1

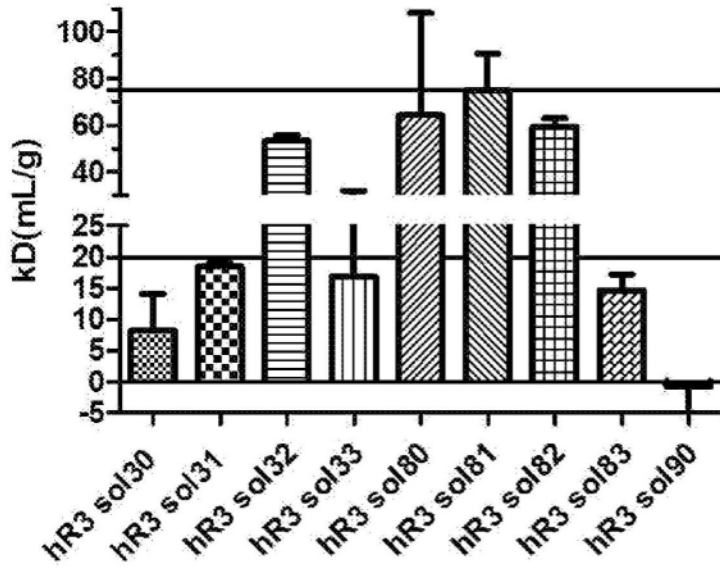


图2

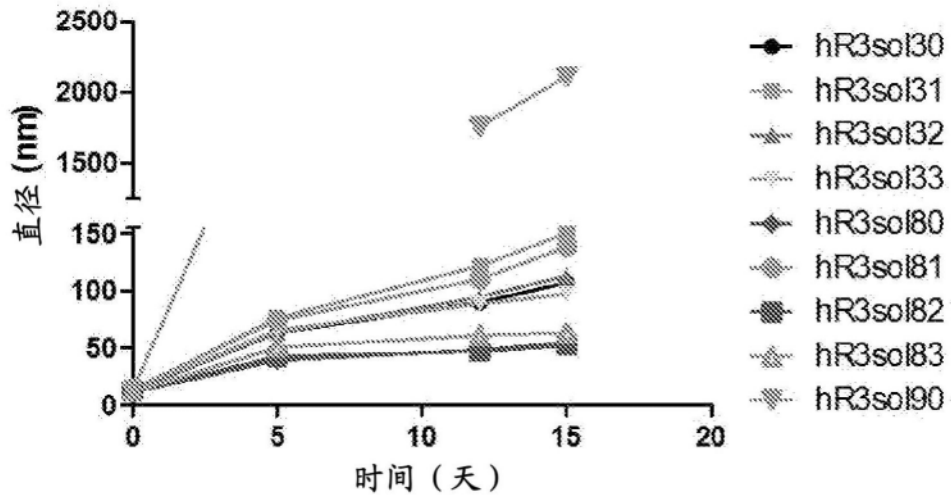


图3

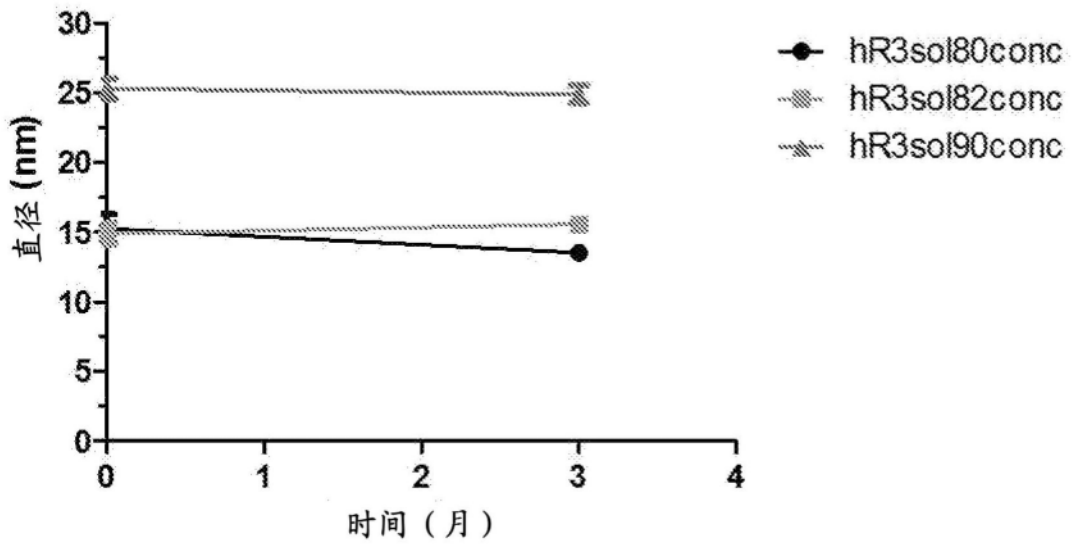


图4

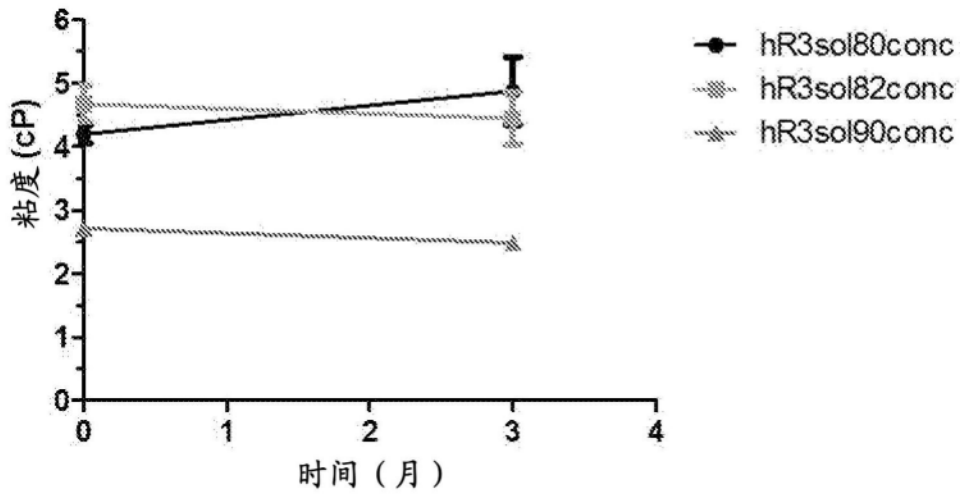


图5

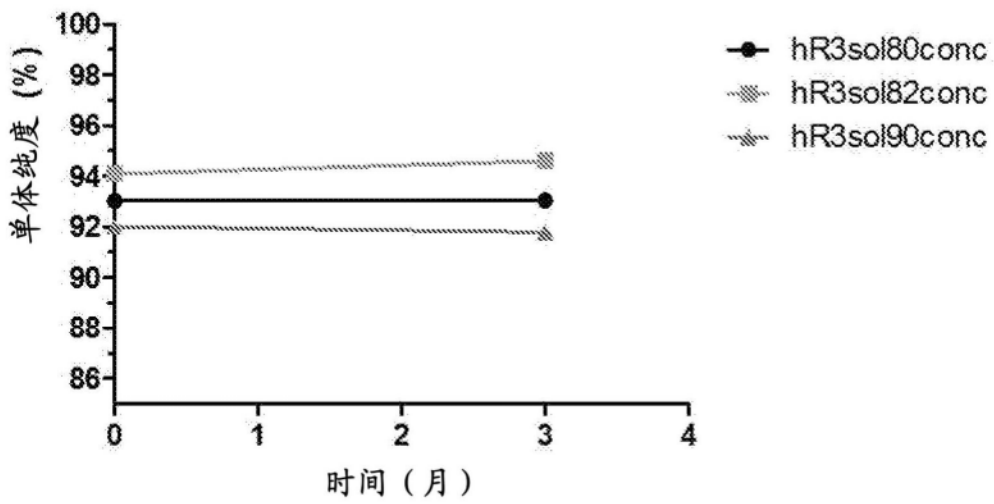


图6

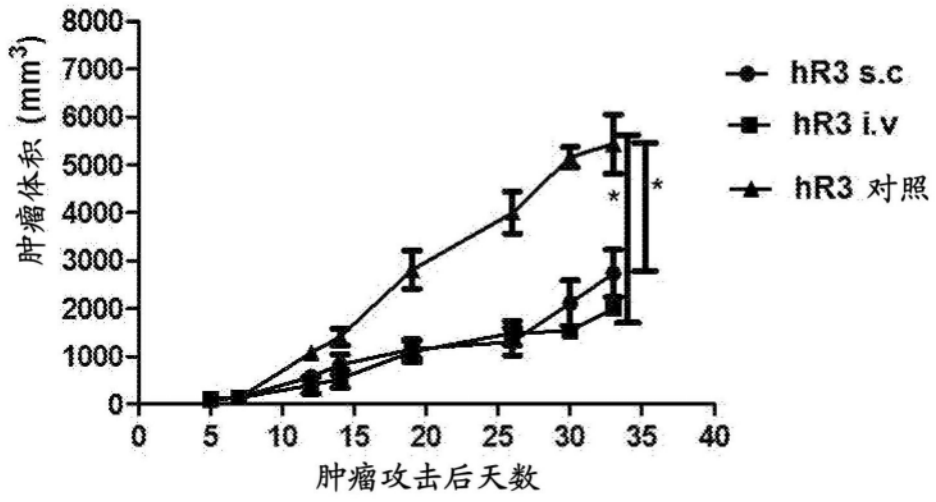


图7