



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106267189 B

(45) 授权公告日 2021. 02. 26

| | | |
|-------------------|----------------|---|
| (21) 申请号 | 201610677975.7 | A61K 47/18 (2006.01) |
| (22) 申请日 | 2011.10.05 | A61K 47/26 (2006.01) |
| (65) 同一申请的已公布的文献号 | | A61K 47/12 (2006.01) |
| 申请公布号 | CN 106267189 A | A61K 47/22 (2006.01) |
| (43) 申请公布日 | 2017.01.04 | C07K 16/28 (2006.01) |
| (30) 优先权数据 | | A61P 17/00 (2006.01) |
| 61/390,283 | 2010.10.06 US | A61P 37/08 (2006.01) |
| 13/253,103 | 2011.10.05 US | A61P 11/06 (2006.01) |
| (62) 分案原申请数据 | | A61M 5/20 (2006.01) |
| 201180058528.9 | 2011.10.05 | A61M 5/315 (2006.01) |
| (73) 专利权人 | 瑞泽恩制药公司 | A61M 5/31 (2006.01) |
| 地址 | 美国纽约州 | (56) 对比文件 |
| (72) 发明人 | D·B·迪克斯 X·唐 | W0 2010042705 A1,2010.04.15 |
| (74) 专利代理机构 | 北京康信知识产权代理有限公司 | W0 2010053751 A1,2010.05.14 |
| 代理人 | 张英 宫传芝 | W0 2010102241 A1,2010.09.10 |
| (51) Int.Cl. | | Gokarn YR等.Self-buffering antibody formulations.《J Pharm Sci》.2008,第97卷(第8期),第3051-3066页. |
| A61K 39/395 | (2006.01) | 审查员 梁欢 |
| | | 权利要求书2页 说明书22页 |
| | | 序列表10页 |

(54) 发明名称

含有抗白介素-4受体 (IL-4R) 的抗体的稳定制剂

(57) 摘要

本发明涉及含有抗白介素-4受体 (IL-4R) 的抗体的稳定制剂。具体地,本发明提供了包含能与白介素-4受体 (hIL-4R) 特异性结合的人抗体的药物制剂。除抗-hIL-4R抗体外,所述制剂可含有至少一种氨基酸、至少一种糖、或至少一种非离子表面活性剂。本发明的药物制剂在储存数月后表现出基本程度上的抗体稳定性。

1. 包含液体药物制剂的容器,其中,所述容器选自预装注射器、笔递送装置和自动注射器,并且其中所述液体药物制剂包含:

(a) 100mg/mL 至200mg/mL 浓度的与人白介素-4受体 α (hIL-4R α) 特异性结合的人抗体,其中,所述抗体包含重链可变区 (HCVR) 和轻链可变区 (LCVR),所述重链可变区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;

(b) 12.5mM \pm 1.85mM浓度的乙酸盐;

(c) 20mM \pm 3mM浓度的组氨酸;

(d) 5%w/v \pm 0.75%w/v浓度的蔗糖;

(e) 0.2%w/v \pm 0.03%w/v浓度的聚山梨酯20或聚山梨酯80;和

(f) 25mM \pm 3.75mM浓度或50mM \pm 7.5mM浓度的精氨酸;其中,所述液体药物制剂具有5.6至6.2的pH。

2. 权利要求1的容器,其中,所述容器是预装注射器。

3. 权利要求2的容器,其中,所述预装注射器是正常钨注射器。

4. 权利要求2的容器,其中,所述预装注射器是低钨注射器。

5. 权利要求2的容器,其中,所述预装注射器包括经涂覆的活塞。

6. 权利要求5的容器,其中,所述经涂覆的活塞涂覆有碳氟化合物膜。

7. 权利要求2的容器,其中,所述预装注射器是低钨注射器,并且其中所述预装注射器包括经涂覆的活塞。

8. 权利要求1的容器,其中,在45℃储存8周后,至少90%的所述抗体具有天然构象。

9. 权利要求1的容器,其中,在45℃储存8周后,低于45%的所述抗体为所述抗体的酸性形式。

10. 权利要求1的容器,其中,在5℃储存6个月后,至少98%的所述抗体具有天然构象。

11. 权利要求1的容器,其中,在25℃储存6个月后,低于4%的回收抗体发生聚集。

12. 权利要求1的容器,其中,所述制剂包含175mg/mL的所述抗体。

13. 权利要求1的容器,其中,所述制剂包含150mg/mL的所述抗体。

14. 权利要求1的容器,其中,所述制剂包含100mg/mL的所述抗体。

15. 权利要求1的容器,其中,所述聚山梨酯是聚山梨酯20。

16. 权利要求1的容器,其中,所述聚山梨酯是聚山梨酯80。

17. 权利要求1的容器,其中,所述精氨酸以25mM \pm 3.75mM 的浓度存在。

18. 权利要求1的容器,其中,所述精氨酸以50mM \pm 7.5mM的浓度存在。

19. 权利要求1的容器,其中,所述制剂包含:

(a) 150 \pm 50.0mg/mL的所述抗体;

(b) 12.5mM \pm 1.85mM乙酸盐;

(c) 20mM \pm 3mM组氨酸;

(d) 5% \pm 0.75%w/v蔗糖;

(e) 0.2%w/v \pm 0.03%w/v聚山梨酯20;和

(f) 25mM \pm 3.75mM精氨酸;

其中,所述液体药物制剂具有5.9 \pm 0.3的pH。

20. 权利要求1的容器,其中,所述制剂包含:

(a) 150 ± 50.0 mg/mL的所述抗体;

(b) 12.5 mM ± 1.85 mM乙酸盐;

(c) 20 mM ± 3 mM组氨酸;

(d) $5\% \pm 0.75\%$ w/v蔗糖;

(e) 0.2% w/v $\pm 0.03\%$ w/v聚山梨酯80;和

(f) 25 mM ± 3.75 mM精氨酸;

其中,所述液体药物制剂具有 5.9 ± 0.3 的pH。

21. 权利要求1的容器,其中,所述制剂包含:

(a) 175 mg/mL的所述抗体;

(b) 12.5 mM ± 1.85 mM乙酸盐;

(c) 20 mM ± 3 mM组氨酸;

(d) $5\% \pm 0.75\%$ w/v蔗糖;

(e) 0.2% w/v $\pm 0.03\%$ w/v聚山梨酯20;和

(f) 50 mM ± 7.5 mM精氨酸;

其中,所述液体药物制剂具有 5.9 ± 0.3 的pH。

22. 权利要求1的容器,其中,所述制剂包含:

(a) 175 mg/mL的所述抗体;

(b) 12.5 mM ± 1.85 mM乙酸盐;

(c) 20 mM ± 3 mM组氨酸;

(d) $5\% \pm 0.75\%$ w/v蔗糖;

(e) 0.2% w/v $\pm 0.03\%$ w/v聚山梨酯80;和

(f) 50 mM ± 7.5 mM精氨酸;

其中,所述液体药物制剂具有 5.9 ± 0.3 的pH。

23. 权利要求1的容器,其中,所述容器是笔递送装置。

24. 权利要求23的容器,其中,所述笔递送装置是(a)可重复使用的笔递送装置;或(b)一次性笔递送装置。

25. 权利要求1的容器,其中,所述容器是自动注射器。

含有抗白介素-4受体 (IL-4R) 的抗体的稳定制剂

[0001] 本申请是申请日为2011年10月05日的题为“含有抗白介素-4受体 (IL-4R) 的抗体的稳定制剂”的中国专利申请号201180058528.9的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及治疗性抗体制剂领域。更具体地,本发明涉及包含与人白介素-4受体特异性结合的人抗体的药物制剂领域。

[0003] 序列表

[0004] 与本说明书一同提交了适用ST.25的序列表文本文件。该文本文件的内容通过引用并入本文。与该ST.25文本文件一致的序列表纸件作为本说明书的一部分包括在说明书内。

背景技术

[0005] 治疗性大分子(例如抗体)应以这样的方式配制,即,不仅使得该分子适合施用于患者,而且还在储存和使用期间保持它们的稳定性。例如,液体溶液中的治疗性抗体易于降解、聚集和/或不期望的化学改变,除非恰当地配制该溶液。液体制剂中抗体的稳定性不仅取决于制剂中使用的赋形剂种类,还取决于赋形剂相对于彼此的量和比例。此外,当制备液体抗体制剂时,除了稳定性之外,还需要考虑其它因素。此类其他考虑的实例包括溶液的粘度和给定制剂能够容纳的抗体浓度,以及制剂的目视质量或外观。因此,当配制治疗抗体时,必须非常仔细以得到保持稳定、含有足够浓度的抗体、以及拥有适当的粘度和其他使得制剂可方便地施用于患者的其他特性的制剂。

[0006] 抗人白介素-4受体 α (hIL-4R α) 的抗体是需要适当配制的治疗相关的大分子的一个实例。抗-hIL-4R α 抗体是临床上有用的,用于治疗或预防疾病,诸如特应性皮炎、变应性哮喘和其他病症。示例性的抗-IL-4R α 抗体尤其描述于美国专利US 7,605,237、7,608,693、7,465,450和7,186,809;以及美国专利申请US 2010-0047254和2010-0021476中。

[0007] 尽管抗-hIL-4R α 抗体是已知的,但在本领域仍然需要包含抗-hIL-4R α 抗体的新药物制剂,其足够稳定并且适合施用于患者。

发明内容

[0008] 发明概述

[0009] 本发明通过提供包含能与白介素-4受体 α (hIL-4R α) 特异性结合的人抗体的药物制剂,从而满足了前述需求。

[0010] 一方面,提供了液体药物制剂,其包括(i) 能与白介素-4受体 α (hIL-4R α) 特异性结合的人抗体;(ii) 缓冲液;(iii) 有机共溶剂;(iv) 热稳定剂和(v) 粘度下降剂。

[0011] 在一个实施方案中,所述抗体以约150mg/ml \pm 50mg/ml的浓度提供。在另一个实施方案中,所述抗体以约150mg/ml \pm 15mg/ml的浓度提供。在一个具体的实施方案中,所述抗体以约150mg/ml的浓度提供。

[0012] 在一个实施方案中,所述抗体包含任何一条或多条SEQ ID NO:1-8的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述抗体包含:(a)包含重链互补决定区1、2和3(HCDR1-HCDR2-HCDR3)的重链可变区(HCVR),所述互补决定区各自包含序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4;以及(b)包含轻链互补决定区1、2和3(LCDR1-LCDR2-LCDR3)的轻链可变区(LCVR),所述互补决定区各自包含序列SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8。在一个具体的实施方案中,所述抗体包含HCVR和LCVR,其各自包含氨基酸序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5。

[0013] 在一个实施方案中,所述抗体包含任何一条或多条SEQ ID NO:9-16的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述抗体包含:(a)包含重链互补决定区1、2和3(HCDR1-HCDR2-HCDR3)的重链可变区(HCVR),所述互补决定区各自包含序列SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;以及(b)包含轻链互补决定区1、2和3(LCDR1-LCDR2-LCDR3)的轻链可变区(LCVR),所述互补决定区各自包含序列SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。在一个具体的实施方案中,所述抗体包含HCVR和LCVR,其各自包含氨基酸序列SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:13。

[0014] 在一个实施方案中,所述抗体包含任何一条或多条SEQ ID NO:17-24的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述抗体包含:(a)包含重链互补决定区1、2和3(HCDR1-HCDR2-HCDR3)的重链可变区(HCVR),所述互补决定区各自包含序列SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;以及(b)包含轻链互补决定区1、2和3(LCDR1-LCDR2-LCDR3)的轻链可变区(LCVR),所述互补决定区各自包含序列SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24。在一个具体的实施方案中,所述抗体包含HCVR和LCVR,其各自包含氨基酸序列SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:21。

[0015] 在一个实施方案中,所述液体制剂的pH为约pH 5.9 \pm 0.5。在一个具体实施方案中,所述液体制剂的pH为约pH 5.9 \pm 0.1。在一个实施方案中,所述液体药用缓冲液包括一种或多种缓冲液,其能够缓冲的范围为约pH5.6至约pH 6.2。

[0016] 在一个实施方案中,所述液体药物制剂包含包括至少2种缓冲液的缓冲系统。在一个实施方案中,所述缓冲系统包括第一缓冲液,其有效pH范围为3.6-5.6,以及第二缓冲液,其有效pH范围为5.5-7.4。在一个实施方案中,第一缓冲液的pKa为约4.8 \pm 0.3,第二缓冲液的pKa为约6.0 \pm 0.3。在一个具体的实施方案中,第一缓冲液是乙酸盐缓冲液,第二缓冲液是组氨酸缓冲液。在一个具体的实施方案中,所述乙酸盐的浓度为12.5mM \pm 1.9mM,组氨酸的浓度为20mM \pm 3mM。

[0017] 在一个实施方案中,有机共溶剂是含有聚氧乙烯部分的非离子聚合物。在某些实施方案中,有机共溶剂是聚山梨酯20、泊洛沙姆181和聚乙二醇3350中的任何一种或多种。在一个特定的实施方案中,有机共聚物是聚山梨酯20。

[0018] 在一个实施方案中,有机共溶剂的浓度为约0.2% \pm 0.03%至约1% \pm 0.15%“重量体积比”或“w/v”,其中,例如0.1g/ml=10%,0.01g/ml=1%)。在一个具体的实施方案中,有机共溶剂是聚山梨酯20,其浓度为约0.2% \pm 0.03%w/v。

[0019] 在一个实施方案中,热稳定剂是糖。在一个实施方案中,所述糖选自蔗糖、甘露醇和海藻糖。在一个具体的实施方案中,所述热稳定剂是蔗糖。

[0020] 在一个实施方案中,热稳定剂浓度为约0.9% \pm 0.135%w/v至约10% \pm 1.5%w/v。在一个具体的实施方案中,所述热稳定剂是浓度为约5% \pm 0.75%w/v的蔗糖。

[0021] 在一个实施方案中,粘度下降剂是盐,其选自精氨酸盐酸盐、硫氰酸钠、硫氰酸铵、硫酸铵、氯化铵、氯化钙、氯化锌和乙酸钠。在一个具体的实施方案中,粘度下降剂是L-精氨酸盐酸盐。

[0022] 在一个实施方案中,粘度下降剂的浓度不超过100mM。在一个实施方案中,粘度下降剂的浓度为 $50\text{mM} \pm 7.5\text{mM}$ 。在另一个实施方案中,粘度下降剂的浓度为 $25\text{mM} \pm 3.75\text{mM}$ 。在一个具体的实施方案中,粘度下降剂是 $25\text{mM} \pm 3.75\text{mM}$ 的L-精氨酸盐酸盐。

[0023] 在一个实施方案中,所述液体药物制剂的粘度小于或等于 35 ± 3.5 厘泊,在一个实施方案中,所述粘度为约 21.5 ± 13.5 厘泊、约 11 ± 1.1 厘泊或约 8.5 ± 0.85 厘泊。在一个具体的实施方案中,所述液体药物制剂的粘度为约 8.5 ± 0.85 厘泊。

[0024] 在一个实施方案中,液体药物制剂的重量摩尔渗透压浓度低于约450mOsm/kg。在一个实施方案中,液体药物制剂的重量摩尔渗透压浓度为约 $290 \pm 20\text{mOsm/kg}$ 。

[0025] 在一个实施方案中,所述液体药物制剂在5℃储存6个月后,至少90%或至少95%的天然形式的抗-hIL-4R α 抗体从该液体药物制剂中回收,其通过尺寸排阻色谱法确定。在一个特定的实施方案中,经尺寸排阻色谱法确定,在5℃储存6个月后,至少98%的天然形式的抗-hIL-4R α 抗体从该液体药物制剂中回收。

[0026] 在一个实施方案中,经尺寸排阻色谱法确定,所述液体药物制剂在45℃储存8周后,至少90%的天然形式的抗体从该液体药物制剂中回收。

[0027] 在一个实施方案中,经阳离子交换色谱确定,所述液体药物制剂在45℃储存8周后,低于45%的抗体为酸性形式。

[0028] 在一个实施方案中,经尺寸排阻色谱法确定,所述液体药物制剂在25℃储存6个月后,低于约4%的抗体发生聚集。

[0029] 一方面提供了液体药物制剂,其包括: (i) 约 $150\text{mg/ml} \pm 50\text{mg/ml}$ 与hIL-4R α 特异性结合的人抗体,其中所述抗体包括重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5; (ii) 约 $12.5\text{mM} \pm 2\text{mM}$ 乙酸盐; (iii) 约 $20\text{mM} \pm 3\text{mM}$ 组氨酸; (iv) 约 $5\% \pm 0.75\%$ (w/v) 蔗糖; (v) 约 $0.2\% \pm 0.03\%$ (w/v) 聚山梨酯20; 以及 (vi) 约 $25\text{mM} \pm 3.75\text{mM}$ 精氨酸, pH为约 5.9 ± 0.5 ,

[0030] 在一个实施方案中,所述液体药物制剂粘度为约 8.5 ± 0.85 厘泊至约 11 ± 1.1 厘泊。在一个具体的实施方案中,所述液体药物制剂粘度为约 8.5 ± 0.85 厘泊。

[0031] 在一个实施方案中,所述液体药物制剂是生理上等渗的。在一个实施方案中,液体药物制剂的重量摩尔渗透压浓度为约 $290 \pm 20\text{mOsm/kg}$ 。

[0032] 在一个实施方案中,经尺寸排阻色谱法确定,在5℃储存6个月后,至少约98%的天然形式的抗-hIL-4R α 抗体从该液体药物制剂中回收。

[0033] 在一个实施方案中,经尺寸排阻色谱法确定,所述液体药物制剂在45℃储存8周后,至少约90%的天然形式的抗-hIL-4R α 抗体从该液体药物制剂中回收。

[0034] 在一个实施方案中,经阳离子交换色谱确定,所述液体药物制剂在45℃储存8周后,低于约45%的抗体为酸性形式。

[0035] 在一个实施方案中,经尺寸排阻色谱法确定,所述液体药物制剂在25℃储存6个月后,低于约4%的抗体发生聚集。

[0036] 一方面,提供了稳定的低粘度等张液体药物制剂,其含有至少100mg/ml的稳定的

抗-hIL4-R α 抗体。在一个实施方案中,所述抗体的浓度为约150mg/ml \pm 50mg/ml。在一个具体的实施方案中,所述抗体浓度为约150mg/ml \pm 15mg/ml。

[0037] 在一个实施方案中,所述抗体包含任何一条或多条SEQ ID NO:1-8的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述抗体包含重链可变区 (HCVR) 和轻链可变区 (LCVR),其中HCVR/LCVR组合分别包括重链和轻链互补决定区 (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3),其分别包含氨基酸序列SEQ ID NOs:2-3-4/SEQ ID NOs:6-7-8。在一个具体的实施方案中,所述抗体包含HCVR和LCVR,其各自包含氨基酸序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5。

[0038] 在某些实施方案中,所述制剂的粘度低于35 \pm 3.5厘泊,低于20 \pm 2厘泊,低于15 \pm 1.5厘泊,或低于10 \pm 1厘泊。在一个具体的实施方案中,所述液体制剂粘度为约8.5 \pm 2.5厘泊。

[0039] 在一个实施方案中,所述制剂的摩尔渗透压浓度是生理上可相容的,在一个具体的实施方案中,所述制剂的摩尔渗透压浓度是290 \pm 20mOsm/kg。

[0040] 在一个实施方案中,所述抗体在约5°C下保存至少约6个月后是稳定的。在一个具体的实施方案中,经尺寸排阻色谱法确定,至少约98%的抗体在5°C下保存约6个月后保留其天然构型。

[0041] 在一个实施方案中,所述抗体在约45°C储存至少约8周后是稳定的。在一个具体的实施方案中,经尺寸排阻色谱法确定,在45°C储存约8周后,至少约90%的抗体保留其天然构型。在一个具体的实施方案中,经阳离子交换色谱确定,在45°C储存约8周后,低于约45%的抗体包含酸性形式。

[0042] 在一个实施方案中,所述抗体在约25°C储存至少约6个月后是稳定的。在一个具体的实施方案中,经尺寸排阻色谱法确定,在25°C储存约6个月后,低于约4%的抗体包含聚集形式。

[0043] 在一个实施方案中,所述制剂包括缓冲液,其pH值为约pH 5.9 \pm 0.5。在一个实施方案中,所述缓冲液包括乙酸缓冲液和组氨酸缓冲液。在一个具体的实施方案中,所述乙酸盐浓度为12.5mM \pm 1.9mM,组氨酸浓度为20mM \pm 3mM。

[0044] 在一个实施方案中,所述制剂包括有机共溶剂,其浓度为约0.2% \pm 0.03%至约1% \pm 0.15%w/v。在一个实施方案中,所述有机共溶剂是非离子聚合物,其含有聚氧乙烯部分。在某些实施方案中,所述有机共溶剂是聚山梨酯20、泊洛沙姆181和聚乙二醇3350中的任何一种或多种。在一个特定的实施方案中,有机共溶剂是浓度为约0.2% \pm 0.03%w/v的聚山梨酯20。

[0045] 在一个实施方案中,所述制剂包括浓度为约0.9% \pm 0.135%w/v至约10% \pm 1.5%w/v的热稳定剂。在一个实施方案中,所述热稳定剂是糖。在一个实施方案中,所述糖选自蔗糖、甘露醇和海藻糖。在一个具体的实施方案中,所述热稳定剂是浓度为约5% \pm 0.75%w/v的蔗糖。

[0046] 在一个实施方案中,所述制剂包括浓度不超过约100mM的粘度下降剂,在一个实施方案中,粘度下降剂是精氨酸。在一个具体的实施方案中,粘度下降剂是浓度为25mM \pm 3.75mM的L-精氨酸盐酸盐。

[0047] 在一个具体的实施方案中,所述稳定的低粘度等渗液体药物制剂的粘度为约8.5 \pm 2.5厘泊,重量摩尔渗透压浓度为约290 \pm 20mOsm/kg,并且包括: (i) 约150mg/ml \pm 15mg/

ml的抗-hIL-4R α 抗体,其中所述抗体包括重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5;(ii) 12.5mM \pm 1.9mM乙酸盐;(iii) 20mM \pm 3mM组氨酸;(iv) 0.2% \pm 0.03% (w/v) 聚山梨酯20;(v) 5% \pm 0.75% (w/v) 蔗糖;以及(vi) 25mM \pm 3.75mM L-精氨酸盐酸盐。根据该实施方案,(i) 经尺寸排阻色谱法确定,至少约98%的抗体在5 $^{\circ}$ C下保存至少约6个月后保留其天然构型,(ii) 经尺寸排阻色谱法确定,在45 $^{\circ}$ C储存约8周后,至少约90%的抗体保持其天然构型,(iii) 经阳离子交换色谱确定,在45 $^{\circ}$ C储存约8周后,低于约45%的抗体包含酸性形式,以及(iv) 经尺寸排阻色谱法确定,在25 $^{\circ}$ C储存约6个月后,低于约4%的抗体包含聚集形式。

[0048] 一方面,任意前述方面的液体药物制剂在容器中提供。在一个实施方案中,所述容器是玻璃瓶,在另一个实施方案中,所述容器是微量输注器。在另一个实施方案中,所述容器是注射器。在一个具体的实施方案中,所述注射器包括碳氟化合物包被的活塞。在一个具体的实施方案中,所述注射器是低钨注射器。

[0049] 本发明的其他实施方案在下文详细描述的基础上是很明显的。

具体实施方式

[0050] 在描述本发明之前,应当理解,本发明不限于所描述的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不是意图用于限制,因为本发明的范围仅由所附权利要求限定。

[0051] 除非另外定义,本文使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。当涉及具体列举的数值或数值范围时,本文使用的术语“约”表示该值可与列举的值有不超过1%的变化。例如,如本文所使用的那样,表述“约100”包括99和101以及之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0052] 尽管可使用与本文描述的类似或等价的任何方法和材料来实施或测试本发明,但现在描述了优选的方法和材料。本文提及的所有公开物均通过引用以其全文并入本文。

[0053] 药物制剂

[0054] 本文使用的表述“药物制剂”表示至少一种活性成分(例如,小分子、大分子、化合物等,其能够在人或非人动物中发挥生物活性)以及至少一种非活性的成分的组合,所述非活性成分当与活性成分和/或一种或多种其他非活性成分组合时,适合于治疗性施用于人或非人动物。除非特别另外指出,本文使用的术语“制剂”的意思是“药物制剂”。本发明提供了包含至少一种治疗性多肽的药物制剂。根据本发明的某些实施方案,该治疗性多肽是与人白介素-4受体 α (hIL-4R α) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。更具体地,本发明包括药物制剂,其包含:(i) 与hIL-4R α 特异性结合的人抗体;(ii) 乙酸/组氨酸缓冲系统;(iii) 有机共溶剂,其为非离子表面活性剂;(iv) 热稳定剂,其为碳水化合物;和(v) 粘度下降剂。包含在本发明范围内的具体示例性成分和制剂详述如下。

[0055] 与hIL-4R特异性结合的抗体

[0056] 本发明的药物制剂可包含能与hIL-4R α 特异性结合的人抗体,或其抗原结合片段。本文使用的术语“hIL-4R α ”是指与白介素-4(IL-4) 特异性结合的人细胞因子受体。在某些实施方案中,包含在本发明药物制剂中的抗体与hIL-4R α 的细胞外结构域特异性结合。示范性的人IL-4受体 α (hIL-4R α) 氨基酸序列描述于SEQ ID NO:25。hIL-4R α 的抗体描述于

U.S.7,605,237和7,608,693中。hIL-4R α 的细胞外结构域由SEQ ID NO:26的氨基酸序列表示。

[0057] 本文使用的术语“抗体”通常是指包含通过二硫键互相连接的四个多肽链即两个重(H)链和两个轻(L)链的免疫球蛋白分子,及其多聚体(例如,IgM);然而,仅由重链组成(即,缺乏轻链)的免疫球蛋白分子也包含在术语“抗体”的定义之内。每一重链包含重链可变区(本文简写为HCVR或V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域:CH1、CH2和CH3。每一轻链包含轻链可变区(本文简写为LCVR或V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(CL1)。V_H和V_L区可进一步细分为高可变区,称为互补决定区(CDR),其与称为框架区(FR)的更保守的区域互相交替。每一个V_H和V_L包含3个CDR和4个FR,从氨基端至羧基端以以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0058] 除非特别另外指出,本文使用的术语“抗体”应当理解为包含完整的抗体分子及其抗原结合片段。本文使用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”(或简称“抗体部分”或“抗体片段”)是指保持了与hIL-4R α 特异性结合能力的抗体的一个或多个片段。

[0059] 本文使用的“分离的抗体”是指基本上没有具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,分离的与hIL-4R α 特异性结合的抗体基本上没有与hIL-4R α 以外的抗原特异性结合的抗体)。

[0060] 术语“特异性结合”等是指抗体或其抗原结合片段与抗原形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合可通过至少约 1×10^{-6} M或更大的解离常数来表征。用于确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域公知的,并且例如包括平衡透析法、表面等离子激元等。然而,分离的与hIL-4R α 特异性结合的抗体可具有与其他抗原的交叉反应性,所述其他抗原诸如是来自其他物种的IL-4R分子。在本文上下文中,与hIL-4R α 以及一种或多种其他抗原结合的多特异性(例如,双特异性)抗体被认为是“特异性结合”hIL-4R α 。此外,分离的抗体可基本上没有其他细胞材料和/或化学物质。

[0061] 可包含在本发明药物制剂中的示例性抗-hIL-4R α 抗体在US 7,605,237和US 7,608,693中得以阐述,其公开内容在此全文引入本文作为参考。

[0062] 根据本发明的某些实施方案,所述抗-hIL-4R α 抗体是包含IGHV3-9亚型的重链可变区和IGKV2-28亚型的轻链可变区的人IgG1(参见Barbie和Lefranc,The Human Immunoglobulin Kappa Variable (IGKV) Genes and Joining (IGKJ) Segments, Exp.Clin.Immunogenet.1998;15:171-183;和Scaviner,D.等,Protein Displays of the Human Immunoglobulin Heavy,Kappa and Lambda Variable and Joining Regions, Exp.Clin.Immunogenet.,1999;16:234-240)。

[0063] 在某些实施方案中,所述抗hIL-4R α 包含至少一个氨基酸替换,其导致相对于种系IGHV3-9序列或种系IGKV2-28序列的抗体表面暴露的电荷发生变化。种系IGHV3-9和种系IGKV2-28序列和氨基酸位点编号与国际免疫遗传学(IMG)信息系统提供的一致,参见Lefranc,M.-P.,等,IMG[®],the international ImMunoGeneTics information system[®],Nucl.Acids Res,37,D1006-D1012(2009)。在某些实施方案中,暴露的表面包括互补决定区(CDR)。在某些实施方案中,氨基酸替换包括:(a)用碱性氨基酸替换IGHV3-9的CDR2中的中性氨基酸(例如58位),(b)用中性氨基酸替换IGHV3-9的CDR3中的酸性氨基酸(例如107位),以及(c)用中性氨基酸替换IGKV2-28的CDR1中的碱性氨基酸(例如33位)。抗体电荷分布的独特变化,特

别是在环境界面(例如在CDR中),预期将会对抗体在溶液中的稳定性造成不可预测的影响。

[0064] 在某些实施方案中,抗hIL-4R α 抗体包含至少一个氨基酸替换,其使得相对于种系IGHV3-9序列或IGKV2-28序列的抗体可变区框架区的扭转应变发生变化。在某些实施方案中,所述氨基酸替换选自:(a)用脯氨酸替换IGHV3-9框架区3(FR3)的非脯氨酸氨基酸(例如96位),以及(b)用非脯氨酸氨基酸替换IGKV2-28框架区2(FR2)的脯氨酸(例如46位)。肽链、尤其是框架区旋转能力的变化影响了CDR和溶剂的界面,其预期能对溶液中抗体的稳定性产生不可预知的影响。

[0065] 根据本发明的某些实施方案,所述抗hIL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:2的重链互补决定区(HCDR)1、SEQ ID NO:3的HCDR2以及SEQ ID NO:4的HCDR3。在某些实施方案中,所述抗hIL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:1的HCVD。

[0066] 根据本发明的某些实施方案,所述抗hIL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:6的轻链(κ)互补决定区(LCDR)1、SEQ ID NO:7的LCDR2以及SEQ ID NO:8的LCDR3。在某些实施方案中,所述抗hIL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:5的LCVD。

[0067] 根据本发明的某些其他实施方案,所述抗hIL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:10的HCDR1,SEQ ID NO:11的HCDR2,SEQ ID NO:12的HCDR3,SEQ ID NO:14的LCDR1,SEQ ID NO:15的LCDR2,以及SEQ ID NO:16的LCDR3。在某些实施方案中,所述抗hIL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:9的HCVD和SEQ ID NO:13的LCVD。

[0068] 根据本发明的某些其他实施方案,所述抗hIL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:18的HCDR1,SEQ ID NO:19的HCDR2,SEQ ID NO:20的HCDR3,SEQ ID NO:22的LCDR1,SEQ ID NO:23的LCDR2,以及SEQ ID NO:24的LCDR3。在某些实施方案中,所述抗hIL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括SEQ ID NO:17的HCVD和SEQ ID NO:21的LCVD。

[0069] 本文实施例中使用的非限制性的示例性的抗体称为“mAb1”。这一抗体在US 7,608,693中也称为H4H098P.mAb1(H4H098P)包含具有SEQ ID NOs:1/5的HCVR/LCVR氨基酸序列对,以及由SEQ ID NOs:2-3-4/SEQ ID NOs:6-7-8表示的HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域。

[0070] 本发明可使用的另一非限制性的示例的抗体称为“mAb2”。这一抗体在US 7,608,693中也称为H4H083P.mAb2(H4H083P)包含具有SEQ ID NOs:9/13的HCVR/LCVR氨基酸序列对,以及由SEQ ID NOs:10-11-12/SEQ ID NOs:14-15-16表示的HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域。

[0071] 本发明可使用的另一非限制性的示例的抗体称为“mAb3”。这一抗体在US 7,608,693中也称为H4H095P.mAb3(H4H095P)包含具有SEQ ID NOs:17/21的HCVR/LCVR氨基酸序列对,以及由SEQ ID NOs:18-19-20/SEQ ID NOs:22-23-24表示的HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域。

[0072] 包含在本发明药物制剂中的抗体或其抗原结合片段的量可根据制剂要求的特定性质、以及预期使用该制剂的具体环境和目的而不同。在某些实施方案中,该药物制剂是液体制剂,其可含有约100 \pm 10mg/mL至约200 \pm 20mg/mL的抗体;约110 \pm 11mg/mL至约190 \pm 19mg/mL的抗体;约120 \pm 12mg/mL至约180 \pm 18mg/mL的抗体;约130 \pm 13mg/mL至约170 \pm 17mg/mL的抗体;约140 \pm 14mg/mL至约160 \pm 16mg/mL的抗体;或约150 \pm 15mg/mL的抗体。例如,本发明的制剂可包括约90mg/mL;约95mg/mL;约100mg/mL;约105mg/mL;约110mg/mL;约

115mg/mL; 约120mg/mL; 约125mg/mL; 约130mg/mL; 约131mg/mL; 约132mg/mL; 约133mg/mL; 约134mg/mL; 约135mg/mL; 约140mg/mL; 约145mg/mL; 约150mg/mL; 约155mg/mL; 约160mg/mL; 约165mg/mL; 约170mg/mL; 约175mg/mL; 约180mg/mL; 约185mg/mL; 约190mg/mL; 约195mg/mL; 或约200mg/mL的能与hIL-4R α 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0073] 赋形剂和pH

[0074] 本发明的药物制剂包含一种或多种赋形剂。本文使用的术语“赋形剂”是指添加至制剂中的任何非治疗性物质, 以提供期望的稠度、粘度或稳定性。

[0075] 在某些实施方案中, 本发明的药物制剂包含至少一种有机共溶剂, 其类型和含量使之在粗重操作例如涡旋条件下能够稳定hIL-4R α 抗体。在某些实施方案中, “稳定”表示在整个粗重操作过程中防止超过抗体总量2%的抗体聚集(基于摩尔量)。在某些实施方案中, 粗重操作是使包含抗体和有机共溶剂的溶液涡旋约120分钟。

[0076] 在某些实施方案中, 有机共溶剂是非离子表面活性剂, 例如烷基聚(氧化乙烯)。可包括在本发明的制剂中的特定的非离子表面活性剂包括: 例如聚山梨酯, 如聚山梨酯20, 聚山梨酯28, 聚山梨酯40, 聚山梨酯60, 聚山梨酯65, 聚山梨酯80, 聚山梨酯81和聚山梨酯85。泊洛沙姆例如泊洛沙姆181, 泊洛沙姆188, 泊洛沙姆407或聚乙二醇(PEG)。聚山梨酯20也称为吐温20、脱水山梨醇单月桂酸酯和聚氧乙烯山梨坦单月桂酸酯, 泊洛沙姆181也称为PLURONIC F68。

[0077] 本发明的药物制剂中所含的有机共溶剂的量可根据制剂所需的特定性质、以及预期使用该制剂的具体环境和目的而不同。在某些实施方案中, 该制剂可含有约0.1% \pm 0.01%至约2% \pm 0.2%的表面活性剂。例如, 本发明的制剂可包含约0.09%; 约0.10%; 约0.11%; 约0.12%; 约0.13%; 约0.14%; 约0.15%; 约0.16%; 约0.17%; 约0.18%; 约0.19%; 约0.20%; 约0.21%; 约0.22%; 约0.23%; 约0.24%; 约0.25%; 约0.26%; 约0.27%; 约0.28%; 约0.29%或约0.30%聚山梨酯20或泊洛沙姆181。例如, 本发明的制剂可包含约0.5%; 约0.6%; 约0.7%; 约0.8%; 约0.9%; 约1%; 约1.1%; 约1.2%; 约1.3%; 约1.4%; 约1.5%; 约1.6%; 约1.7%; 约1.8%; 约1.9%或约2.0%的PEG 3350。

[0078] 稳定hIL-4R α 抗体的示范性的有机共溶剂包括0.2% \pm 0.02%的聚山梨酯20、0.2% \pm 0.02%泊洛沙姆181或1% \pm 0.1%PEG 3350。

[0079] 本发明的药物制剂还可包含一种或多种热稳定剂, 其类型和含量能够在热应激条件下稳定hIL-4R α 抗体。在某些实施方案中, “稳定”表示当含有抗体和热稳定剂的溶液在约45°C保留多达约28天时, 超过约92%的抗体保持在天然构型。在某些实施方案中, “稳定”是指当含有抗体和热稳定剂的溶液在约45°C保留多达约28天时, 低于约5%的抗体发生聚集。

[0080] 在某些实施方案中, 热稳定剂是糖或糖醇, 其选自蔗糖、海藻糖和甘露醇或其任意组合, 其含量可根据预期使用该制剂的具体环境和目的而不同。在某些实施方案中, 所述制剂可含有约2.5%至约10%的糖或糖醇; 约3%至约9.5%的糖或糖醇; 约3.5%至约9%的糖或糖醇; 约4%至约8.5%的糖或糖醇; 约4.5%至约8%的糖或糖醇; 约5%至约7.5%的糖或糖醇; 约5.5%至约7%的糖或糖醇; 或约6.0%至约6.5%的糖或糖醇。例如, 本发明的药物制剂可包含约2.5% \pm 0.375%; 约3% \pm 0.45%; 约3.5% \pm 0.525%; 约4.0% \pm 0.6%; 约4.5% \pm 0.675%; 约5.0% \pm 0.75%; 约5.5% \pm 0.825%; 约6.0% \pm 0.9%; 约6.5% \pm 0.975%; 约7.0% \pm 1.05%; 约7.5% \pm 1.125%; 约8.0% \pm 1.2%; 8.5% \pm 1.275%; 约

9.0%±1.35%或约10.0%±1.5%的糖或糖醇(例如蔗糖、海藻糖或甘露醇)。

[0081] 本发明的药物制剂还可包含缓冲液或缓冲系统,其用于维持稳定的pH值,帮助稳定hIL-4R α 抗体。在某些实施方案中,“稳定”表示当含有抗体和缓冲液的溶液在约45℃下放置多达约14天时,低于3.0%±0.5%的抗体发生聚集。在某些实施方案中,“稳定”表示当含有抗体和缓冲液的溶液在约25℃下放置多达约6个月时,低于3.7%±0.5%的抗体发生聚集。在某些实施方案中,“稳定”表示当含有抗体和缓冲液的溶液在约45℃下放置多达约14天时,经尺寸排阻色谱法测定至少95%±0.5%的抗体保留其天然构象。在某些实施方案中,“稳定”表示当含有抗体和缓冲液的溶液在约25℃下放置多达约6个月时,经尺寸排阻色谱法测定至少96%±0.5%的抗体保留其天然构象。在某些实施方案中,“稳定”表示当含有抗体和缓冲液的溶液在约45℃下放置多达约14天时,经阳离子交换色谱确定至少62%±0.5%的抗体保持中性构象。在某些实施方案中,“稳定”表示当含有抗体和缓冲液的溶液在约25℃下放置多达约6个月时,经阳离子交换色谱确定至少54%±0.5%的抗体保持中性构象。“中性构象”表示从离子交换树脂上洗脱下来的主峰的抗体组分,通常在其一侧具有更多个“碱性”峰,而另一侧具有更多个“酸性”峰。

[0082] 本发明的药物制剂的pH值可为约5.2至约6.4。例如,本发明的制剂的pH可以为约5.2;约5.3;约5.4;约5.5;约5.6;约5.7;约5.8;约5.9;约6.0;约6.1;约6.2;约6.3或约6.4,在某些实施方案中,pH为约5.3±0.2;约5.9±0.2或约6.0±0.2。

[0083] 在某些实施方案中,所述缓冲液或缓冲系统包括至少一种缓冲液,其缓冲范围与pH5.2-6.4完全或部分重叠。在一个实施方案中,所述缓冲液或缓冲系统包括两种缓冲液,第一种的有效pH范围为3.6-5.6,第二种的有效pH范围为5.5-7.4。在一个实施方案中,第一缓冲液的pKa为约4.8±0.3,第二缓冲液的pKa为约6.0±0.3。在某些实施方案中,缓冲系统包括乙酸盐缓冲液和组氨酸缓冲液。在某些实施方案中,每1份乙酸盐具有约1.3-1.9份组氨酸(摩尔)。在某些实施方案中,每1份乙酸盐具有约1.6±0.25份组氨酸(摩尔)。在某些实施方案中,乙酸盐的浓度为约2.5mM至约22.5mM;约3.0mM至约22mM;约3.5mM至约21.5mM;约4.0mM至约21.0mM;约4.5mM至约20.5mM;约5.0mM至约20mM;约5.5mM至约19.5mM;约6.0mM至约19.0mM;约6.5mM至约18.5mM;约7.0mM至约18.0mM;约7.5mM至约17.5mM;约8.0mM至约17mM;约8.5mM至约16.5mM;约9.0mM至约16.0mM;约9.5mM至约15.5mM;约10.0mM至约15.0mM;约10.5mM至约14.5mM;约12.5mM±1.875mM;约11.0mM至约14.0mM;约11.5mM至约13.5mM或约12.0mM至约13.0mM。在某些实施方案中,组氨酸的浓度为约10mM至约30mM;约11mM至约29mM;约12mM至约28mM;约13mM至约27mM;约14mM至约26mM;约15mM至约25mM;约16mM至约24mM;约17mM至约23mM;约18mM至约22mM或约19mM至约21mM。在某些实施方案中,所述缓冲系统包含约12.5mM的乙酸盐和约20mM的组氨酸,pH为约5.9。

[0084] 本发明的药物制剂还可包含一种或多种赋形剂,其用于维持低粘度或降低含有高浓度蛋白(例如通常>100mg/ml的蛋白)的制剂的粘度。在某些实施方案中,所述制剂包含精氨酸,其含量足以使所述制剂的粘度维持在约35厘泊以下,约30厘泊以下,约25厘泊以下,约20厘泊以下,约15厘泊以下,约14厘泊以下,约13厘泊以下,约12厘泊以下,约10厘泊以下,或约9厘泊以下。

[0085] 在某些实施方案中,本发明的药物制剂含有精氨酸,优选L-精氨酸盐酸盐,其浓度

为约25mM \pm 3.75mM, 约50mM \pm 7.5mM, 或约100mM \pm 15mM。在某些实施方案中, 所述精氨酸浓度为约20mM至约30mM, 约21mM至约29mM, 约21.25mM至约28.75mM, 约22mM至约28mM, 约23mM至约27mM或约24mM至约26mM。

[0086] 示例性制剂

[0087] 根据本发明的一个方面, 药物制剂是低粘度的、通常是生理上等渗的液体制剂, 其包括: (i) 能特异性结合hIL-4R α 的人抗体 (例如mAb1、mAb2或mAb3[见上文]), 浓度为约100mg/ml或更高; (ii) 在约5.9 \pm 0.6提供足够缓冲的缓冲系统; (iii) 尤其是作为热稳定剂的糖; (iv) 有机共溶剂, 其保护抗体结构的完整性; 以及(v) 氨基酸, 其控制粘度用于皮下注射。

[0088] 根据一个实施方案, 该药物制剂包括: (i) 能特异性结合hIL-4R α 的人IgG1抗体, 其包括取代的IGHV3-9型重链可变区和取代的IGLV2-28型轻链可变区 (例如mAb1), 浓度为约100mg/ml至约200mg/ml; (ii) 包括乙酸盐和组氨酸的缓冲系统, 其在约pH 5.9 \pm 0.6有效缓冲; (iii) 用作热稳定剂的蔗糖; (iv) 用作有机共溶剂的聚山梨酯; 以及(v) 用作粘度下降剂的精氨酸。

[0089] 根据一个实施方案, 该药物制剂包括: (i) 能特异性结合hIL-4R α 的人IgG1抗体, 其包括SEQ ID NO:2的HCDR1、SEQ ID NO:3的HCDR2、SEQ ID NO:4的HCDR3、SEQ ID NO:6的LCDR1、SEQ ID NO:7的LCDR2和SEQ ID NO:8的LCDR3, 浓度为约150mg/ml \pm 25mg/ml; (ii) 约12.5mM \pm 1.9mM的乙酸盐、约20mM \pm 3mM的组氨酸, 其有效缓冲在约pH 5.9 \pm 0.3; (iii) 约5%w/v \pm 0.75%w/v的蔗糖; (iv) 约0.2%w/v \pm 0.03%w/v的聚山梨酯20; 以及(v) 约25mM \pm 3.75mM的精氨酸, 其为L-精氨酸盐酸盐。

[0090] 包含在本发明中的药物制剂的其他非限制性实例在本文其他地方阐述, 包括以下提供的工作实施例。

[0091] 药物制剂的稳定性和粘度

[0092] 本发明的药物制剂通常显示出高水平的稳定性。本文就药物制剂而言使用的术语“稳定的”是指药物制剂中的抗体在限定条件下储存后保持可接受程度的化学结构或生物学功能。即使包含于其中的抗体在储存一定时间后没有保持100%的其化学结构或生物学功能, 制剂也可以是稳定的。在某些环境下, 储存一定时间后, 保持约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的抗体结构或功能, 可以认为是“稳定的”。

[0093] 可尤其通过确定在给定温度下储存一定时间后制剂中剩余的天然抗体百分比来测定稳定性。天然抗体百分比可尤其通过尺寸排阻色谱法 (例如, 尺寸排阻高效液相色谱法[SE-HPLC]) 来确定天然抗体百分比。本文使用的短语“可接受程度的稳定性”表示在给定温度下储存一定时间后, 在制剂中能检测到至少90%的天然形式的抗体。在某些实施方案中, 在给定温度下储存一定时间后, 在制剂中能检测到至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的天然形式的抗体。在其之后测定稳定性的限定时间可以是至少2周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月或更久。评估稳定性时可储存药物制剂的温度可以是约-80 $^{\circ}$ C至约45 $^{\circ}$ C的任何温度, 例如, 在约-30 $^{\circ}$ C、约-20 $^{\circ}$ C、约0 $^{\circ}$ C、约4 $^{\circ}$ -8 $^{\circ}$ C、约5 $^{\circ}$ C、约25 $^{\circ}$ C或约45 $^{\circ}$ C储存。例如, 如果在5 $^{\circ}$ C储存3个月后, 通过SE-HPLC检测到超过约90%、95%、96%、97%或98%的天然抗体, 则

认为该药物制剂是稳定的。如果在5℃储存6个月后,通过SE-HPLC检测到超过约90%、95%、96%、97%或98%的天然抗体,则也认为该药物制剂是稳定的。如果在5℃储存9个月后,通过SE-HPLC检测到超过约90%、95%、96%、97%或98%的天然抗体,则也认为该药物制剂是稳定的。如果在25℃储存3个月后,通过SE-HPLC检测到超过约90%、95%、96%或97%的天然抗体,则也认为该药物制剂是稳定的。如果在25℃储存6个月后,通过SE-HPLC检测到超过约90%、95%、96%或97%的天然抗体,则也认为该药物制剂是稳定的。如果在25℃储存9个月后,通过SE-HPLC检测到超过约90%、95%、96%或97%的天然抗体,则也认为该药物制剂是稳定的。

[0094] 可尤其通过确定在给定温度下储存一定时间后制剂中聚集形式的抗体百分比来测定稳定性,其中稳定性与形成的聚集体百分比成反比。聚集抗体百分比可尤其通过尺寸排阻色谱法(例如,尺寸排阻高效液相色谱法[SE-HPLC])来确定。本文所用的“可接受程度的稳定性”表示在给定温度下储存一定时间后,在制剂中最多能检测到5%的聚集形式的抗体。在某些实施方案中,在给定温度下储存一定时间后,在制剂中最多能检测到约5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的聚集形式的抗体。在其之后测定稳定性的限定时间可以是至少2周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月或更久。评估稳定性时可储存药物制剂的温度可以从约-80℃至约45℃的任何温度,例如,在约-30℃、约-20℃、约0℃、约4°-8℃、约5℃、约25℃或约45℃储存。例如,如果在5℃储存3个月后,检测到低于约5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的聚集形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。如果在5℃储存6个月后,检测到低于约5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的聚集形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。如果在5℃储存9个月后,检测到低于约5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的聚集形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。如果在25℃储存3个月后,检测到低于约5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的聚集形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。如果在25℃储存6个月后,检测到低于约5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的聚集形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。如果在25℃储存9个月后,检测到低于约5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的聚集形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。

[0095] 可尤其通过确定在离子交换过程中迁移至更酸性的部分的抗体(“酸性形式”)而非抗体主要部分(“中性构象”)的百分比来测定稳定性,其中稳定性与酸性形式抗体的部分成反比。不希望受任何理论限制,抗体的脱酰胺作用可使抗体带更多负电荷,因此相对于未脱酰胺的抗体更为酸性(参见例如Robinson,N.,Protein Deamidation,PNAS,2002年4月16日,99(8):5283-5288)。“酸化的”或“脱酰胺的”抗体百分比可尤其通过离子交换色谱测定(例如阳离子交换高效液相色谱[CEX-HPLC])。这里所用的术语“可接受程度的稳定性”表示在给定温度下储存一定时间后,在制剂中最多能检测到45%的酸性形式的抗体。在某些实施方案中,可接受程度的稳定性表示在给定温度下储存一定时间后,在制剂中最多能检测到约45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的酸性形式抗体。在其之后测定稳定性的限定时间可以是至少2周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月或更久。评估稳定性时可储存药物

制剂的温度可以是约-80℃至约45℃的任何温度,例如,在约-30℃、约-20℃、约0℃、约4℃-8℃、约5℃、约25℃或约45℃储存。例如,如果在5℃储存3个月后,检测到低于约15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的酸性形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。同样,如果在25℃储存3个月后,检测到低于约18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的酸性形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。如果在45℃储存8周后,检测到低于约45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的酸性形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。如果在40℃储存2周后,检测到低于约20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的酸性形式的抗体,则认为该药物制剂是稳定的。

[0096] 可用其他方法评估本发明制剂的稳定性,例如,用以确定热稳定性的差示扫描量热法(DSC)、用以确定机械稳定性的受控搅拌、以及用以确定溶液浊度的约350nm或约405nm的吸光度。例如,如果在约5℃至约25℃储存6个月或更久后,与制剂在 $t=0$ 时的OD₄₀₅相比该制剂的OD₄₀₅的改变小于约0.05(例如,0.04、0.03、0.02、0.01或更少),则可认为本发明的制剂是稳定的。

[0097] 还可通过测量抗体对其靶标的生物活性和/或结合亲和力来评估稳定性。例如,如果在例如5℃、25℃、45℃等储存一定时间(例如,1-12个月)后,包含在制剂中的抗-IL-4R α 抗体以在所述储存之前抗体结合亲和力的至少90%、95%或更高的亲和力与IL-4R α 结合,则可认为本发明的制剂是稳定的。结合亲和力可通过例如ELISA或等离子体共振测定。生物活性可通过例如IL-4R α 活性试验进行确定,例如使表达IL-4R α 的细胞与包含抗IL-4R α 抗体的制剂接触。抗体与所述细胞的结合可直接测定,例如通过FACS分析测定。或者,IL-4R α 系统的下游活性可在抗体和IL-4R α 激动剂存在下测定,并与无抗体情况下IL-4R α 系统的活性进行比较。在某些实施方案中,IL-4R α 可以是细胞内源性的。在其他实施方案中,IL-4R α 可在细胞内异位表达。

[0098] 评估制剂中抗体稳定性的其他方法在以下实施例中说明。

[0099] 在某些实施方案中,本发明的液体药物制剂可展现出低至中度的粘度水平。本文使用的术语“粘度”可以是“运动粘度”或“绝对粘度”。“运动粘度”是在重力影响下流体的阻止流动的量度。当将两个等体积的流体置于相同的毛细管粘度计中并允许其借助重力流动时,粘的流体比更不粘的流体需要更长的时间流过该毛细管。例如,如果一种流体花200秒完成其流动,而另一流体花400秒,则第二种流体的运动粘度度量是第一种的两倍。“绝对粘度”有时也称为动力学或简单粘度,是运动粘度和流体密度的结果(绝对粘度=运动粘度 \times 密度)。运动粘度的单位是 L^2/T ,其中L是长度,T为时间。通常,运动粘度表示为厘沱(cSt)。运动粘度的SI单位是 mm^2/s ,其为1cSt。绝对粘度表示为厘泊(cP)单位。绝对粘度的SI单位是毫帕斯卡-秒(mPa-s),其中1cP=1mPa-s。

[0100] 如本文使用的那样,就本发明的流体制剂而言的低粘度水平将展现出低于约15厘泊(cP)的绝对粘度。例如,当应用标准粘度测量技术测量时,如果制剂展现出约15cP、约14cP、约13cP、约12cP、约11cP、约10cP、约9cP、约8cP或更低的绝对粘度时,将认为本发明的流体制剂具有“低粘度”。如本文使用的那样,就本发明的流体制剂而言的中等粘度水平将展现出约35cP至约15cP之间的绝对粘度。例如,当应用标准粘度测量技术测量时,如果制剂

展现出约34cP、约33cP、约32cP、约31cP、约30cP、约29cP、约28cP、约27cP、约26cP、约25cP、约24cP、约23cP、约22cP、约21cP、约20cP、约19cP、18cP、约17cP、约16cP或约15.1cP的绝对粘度时,将认为本发明的流体制剂具有“中等粘度”。

[0101] 如以下实施例所示,发明人出人意料地发现,通过将抗体与约25mM至约100mM的精氨酸一起配制时,能够获得包含高浓度的抗-hIL-4R α 抗体(例如,约100mg/ml至高达至少200mg/ml)的低至中等粘度的流体制剂。此外,还发现通过调节蔗糖含量至低于约10%,能够更大程度地降低制剂粘度。

[0102] 药物制剂的容器及施用方法

[0103] 本发明的药物制剂可包含在任何适于储存药物以及其他药物组合物的容器中。例如,本发明的药物制剂可包含在具有一定体积的密封及灭菌的塑料或玻璃容器中,诸如小瓶、安瓿、注射器、药筒或瓶子。不同类型的小瓶可用于包含本发明的制剂,例如包括透明和不透明(例如,琥珀色)玻璃或塑料小瓶。同样地,可应用不同类型的注射器来容纳和/或施用本发明的药物制剂。

[0104] 本发明的药物制剂可包含在“正常钨”注射器或“低钨”注射器中。如本领域技术人员可理解的那样,制备玻璃注射器的方法包括应用热的钨棒,其用于刺穿玻璃,由此产生液体可被吸入或从注射器排出的孔。这一方法导致了在注射器内表面上沉积痕量的钨。可应用随后的洗涤和其他加工步骤来减少注射器中的钨量。本文使用的术语“正常钨”是指注射器含有超过500十亿分之一(ppb)的钨。术语“低钨”是指注射器含有低于500ppb的钨。例如,根据本发明的低钨注射器可含有低于约490、480、470、460、450、440、430、420、410、390、350、300、250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10或更低ppb的钨。

[0105] 注射器中使用的橡胶活塞以及用于封闭小瓶开口的橡胶塞可被涂覆,从而防止注射器或小瓶中药物成分的污染和/或保持其稳定性。因此,根据某些实施方案,本发明的药物制剂可包含在具有经涂覆的活塞的注射器中,或在用经涂覆的橡胶塞密封的小瓶中。例如,活塞或塞子可用碳氟化合物膜涂覆。适于与含有本发明药物制剂的小瓶和注射器一起使用的经涂覆的塞子或活塞的实例例如在美国专利号4,997,423、5,908,686、6,286,699、6,645,635和7,226,554中提及,其内容在此以其全文引入作为参考。可用于本发明上下文中的具体的示例性涂覆的橡胶塞和活塞可从West Pharmaceutical Services公司(Lionville,PA)以商标名“**FluroTec®**”获得。

[0106] 根据本发明的某些实施方案,该药物制剂可包含在低钨注射器中,所述注射器具有碳氟化合物涂覆的活塞。

[0107] 药物制剂可通过肠胃外途径施用于患者,诸如注射(例如,皮下、静脉内、肌内、腹膜内等)、或经皮、粘膜、鼻、呼吸道和/或口腔施用。可应用多种可重复使用的笔和/或自动注射器递送装置来皮下递送本发明的药物制剂。实例包括但不限于AUTOPEN™(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, 瑞士)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN™I、II和III(Novo Nordisk, Copenhagen, 丹麦)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk, Copenhagen, 丹麦)、BD™笔(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和OPTICLIK™(sanofi-aventis, Frankfurt, 德国)。可用于皮下递送本发明药物组合物的一次性笔和/或自动注射器递送装

置的实例包括但不限于SOLOSTARTM笔(sanofi-aventis)、FLEXPENTM(Novo Nordisk)、以及KWIKPENTM(Eli Lilly)、SURECLICKTM自动注射器(Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLETTM(Haselmeier, Stuttgart, 德国)、EPIPEN(Dey, L.P.)和HUMIRATM笔(Abbott Labs, Abbott Park, IL)。

[0108] 微量输液器用于递送本发明制剂的用途也包含在本文之内。本文使用的术语“微量输液器”表示设计用于在较长时间(例如, 约10、15、20、25、30分钟或更长)内缓慢施用大体积(例如, 约2.5mL或更多)治疗制剂的皮下递送装置。例如参见U.S. 6,629,949、US 6,659,982和Meehan等, J. Controlled Release 46:107-116 (1996)。微量输液器尤其可用于递送包含在高浓度(例如, 约100、125、150、175、200mg/mL或更高)和/或粘稠溶液中的大剂量治疗蛋白。

[0109] 在一个实施方案中, 用自动注射器中的预装注射器皮下施用约1ml \pm 0.15ml体积的含有约150mg/ml \pm 15mg/ml抗-IL-4R α 抗体的液体药物制剂。在另一个实施方案中, 所述制剂用微量输液器施用的体积为约1ml至2.5ml。所述制剂可预装于小袋或筒中, 以供微量输液器使用。

[0110] 药物制剂的治疗用途

[0111] 本发明药物制剂尤其可用于治疗、预防和/或缓解任何与IL-4活性相关的疾病或病症, 包括由IL-4R α 的活化介导的疾病或病症。可通过施用本发明的药物制剂治疗或预防的示例性、非限制性的疾病和病症包括各种特应性疾病例如特应性皮炎、变应性结膜炎、变应性鼻炎、哮喘和其他IgE/Th2介导的疾病。

[0112] 因此, 本发明包括治疗、预防或缓解任何与IL-4活性或IL-4R α 活化相关的疾病或病症(包括上文提及的示例性疾病、病症和病状)的方法。本发明的治疗方法包括向个体施用本文公开的任何包含抗-hIL-4R α 抗体的制剂。施用该药物制剂的个体可以例如是需要此类治疗、预防或缓解, 或以其他方式受益于抑制或弱化IL-4和/或IL-4R α 介导的活性的任何人或非人动物。例如, 该个体可以是诊断患有、或认为有风险罹患任何前述疾病或病症的个体。本发明还包括本文公开的任何药物制剂在制备用于治疗、预防或缓解任何与IL-4活性或IL-4R α 活化相关的疾病或病症(包括上文提及的示例性疾病、病症和病状)的药物中的用途。

[0113] 实施例

[0114] 提供了以下实施例, 以便为本领域技术人员提供如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和说明, 并且不意味着限制发明人认为的本发明范围。已经尽力确保所使用数字(例如, 量、温度等)的精确, 但需考虑一些实验误差和偏差。除非另外指出, 份数是指重量份数, 分子量是平均分子量, 温度是摄氏度, 以及压力是或接近大气压力。

[0115] 最初的制剂开发行为包括筛选液体mAb1(本发明的抗-IL-4R α 抗体)制剂中的有机共溶剂、热稳定剂和缓冲液, 以鉴定在维持皮下注射剂的渗透压和粘度的同时与所述蛋白相容并提高其稳定性的赋形剂。同样检验了缓冲条件以确定达到最大蛋白稳定性的最优pH值。

[0116] 实施例1. 有机共溶剂

[0117] 观察到mAb1在搅拌条件下不稳定。反相高效液相色谱(RP-HPLC)和尺寸排阻高效液相色谱(SE-HPLC)分析表明当mAb1在室温下涡旋后蛋白损失并且蛋白聚集增加(表1, 参

见“无共溶剂”数据)。SE-HPLC和RP-HPLC测定表明,向mAb1溶液中加入有机共溶剂防止了蛋白的降解(表1)。然而,观察到加入某些有机共溶剂降低了mAb1的热稳定性(表2)。热应激后的RP-HPLC表明(表2),含PEG 3350 (3%)和PEG 300 (10%和20%)的制剂的蛋白回收率出现了不同程度的下降。此外,经SE-HPLC确定,与无共溶剂的制剂相比,含有PLURONIC F68 (泊洛沙姆181) (0.2%)、PEG300 (10%和20%)以及丙二醇 (20%)的制剂出现更多的聚集体形成。聚山梨酯20 (0.2%)和聚山梨酯80 (0.2%)提供了相当的搅拌和热应激稳定性。

[0118] 根据表1,0.3ml 15mg/ml的mAb1在10mM磷酸盐溶液 (pH 6.0) 以及不同浓度的有机共溶剂在2ml的玻璃瓶中涡旋约120分钟。通过在405nm处的光密度 (OD) 确定浊度,记录为与起始材料相比在405nm处OD值的相对变化。通过反相HPLC (RP-HPLC) 测定总的mAb1回收百分比。天然和聚集的mAb1的百分比通过尺寸排阻HPLC (SE-HPLC) 测定。“起始材料”栏内的SE-HPLC结果是无涡旋条件下各制剂的平均值。

[0119] 表1

| [0120] | 有机共溶剂 | 目视外观 | 浊度 | pH | % 总 mAb1 (RP-HPLC) | % 天然 mAb1 (SE-HPLC) | % mAb1 聚集体 (SE-HPLC) |
|--------|----------------------------|------|------|-----|-----------------------|---------------------------|----------------------------|
| | 起始材料 ² (无涡旋) | 通过 | 0.00 | 6.0 | 100 | 96.8 | 1.8 |
| | 无共溶剂 | 未通过 | 0.87 | 6.0 | 86 | 95.6 | 3.5 |
| | 0.2% 聚山梨酯 20 | 通过 | 0.01 | 5.9 | 98 | 97.0 | 1.7 |
| | 0.2% 聚山梨酯 80 | 通过 | 0.00 | 5.9 | 100 | 96.6 | 2.0 |
| | 0.2% Pluronic F68 | 通过 | 0.00 | 5.9 | 99 | 96.9 | 1.7 |
| | 3% PEG 3350 | 通过 | 0.00 | 6.0 | 102 | 96.7 | 2.0 |
| | 1% PEG 3350 | 通过 | 0.01 | 6.0 | 99 | 96.8 | 1.8 |
| | 20% PEG 300 | 通过 | 0.01 | 5.9 | 101 | 96.1 | 2.6 |
| | 10% PEG 300 | 通过 | 0.01 | 6.0 | 100 | 96.7 | 2.0 |
| [0121] | 20% 丙二醇 | 通过 | 0.00 | 6.0 | 101 | 96.7 | 2.0 |

[0122] 根据表2,将0.3ml 15mg/ml mAb1在10mM磷酸盐溶液 (pH 6.0) 和不同的有机共溶剂在2ml玻璃瓶中在约45℃下保存约28天。通过在405nm处的光密度 (OD) 确定浊度,记录为与起始材料相比在405nm处OD值的相对变化。通过反相HPLC (RP-HPLC) 测定总的mAb1回收百分比。天然和聚集的mAb1的百分比通过尺寸排阻HPLC (SE-HPLC) 测定。起始材料栏内的SE-HPLC结果是无热应激条件下各制剂的平均值。

[0123] 表2

[0124]

| 有机共溶剂 | 目视外观 | 浊度 | pH | % 总 mAb1 (RP-HPLC) | % 天然 mAb1 (SE-HPLC) | % mAb1 聚集体 (SE-HPLC) |
|-------------------|------|------|-----|-----------------------|---------------------------|----------------------------|
| 起始材料 (无加速) | 通过 | 0.00 | 6.0 | 100 | 96.8 | 1.8 |
| 无共溶剂 | 通过 | 0.00 | 6.2 | 98 | 94.9 | 3.5 |
| 0.2% 聚山梨酯 20 | 通过 | 0.00 | 6.3 | 98 | 94.6 | 3.6 |
| 0.2% 聚山梨酯 80 | 通过 | 0.00 | 6.2 | 97 | 94.3 | 3.8 |
| 0.2% Pluronic F68 | 通过 | 0.00 | 6.2 | 96 | 93.0 | 5.1 |
| 3% PEG 3350 | 通过 | 0.00 | 6.2 | 73 | 96.5 | 1.4 |
| 1% PEG 3350 | 通过 | 0.01 | 6.0 | 97 | 94.6 | 3.8 |
| 20% PEG 300 | 通过 | 0.04 | 4.5 | 74 | 8.5 | 87.5 |
| 10% PEG 300 | 通过 | 0.02 | 4.8 | 93 | 57.7 | 38.1 |
| 20% 丙二醇 | 通过 | 0.00 | 6.3 | 97 | 93.6 | 4.7 |

[0125] 实施例2. 热稳定剂

[0126] 检查了多种热稳定剂,例如糖类、氨基酸和无机盐类抑制mAb1保存在约45℃时的降解的能力。表3中列出了所研究的热稳定剂的概述。当在升高温度下孵育时(通过SE-HPLC确定),含有蔗糖或海藻糖的制剂对于溶液中的mAb1具有最好的稳定效果。蔗糖被选为稳定剂,因为其历史上用于单克隆抗体制剂是安全的。

[0127] 根据表3,将0.3ml 25mg/ml的mAb1在10mM乙酸盐溶液(pH 5.3)和不同的热稳定剂在2ml的玻璃瓶中在约45℃保存约28天。通过在405nm处的光密度(OD)确定浊度,记录为与起始材料相比在405nm处OD值的相对变化。所有样品的浊度可忽略不计。通过反相HPLC(RP-HPLC)测定总的mAb1回收百分比。天然和聚集的mAb1的百分比通过尺寸排阻HPLC(SE-HPLC)测定。酸性或碱性组分分别定义为从阳离子交换(CEX-HPLC)柱上洗脱下来的保留时间早于或晚于主峰的mAb1峰的总和。起始材料栏内的SE-HPLC结果是无热应激条件下各制剂的平均值。

[0128] 表3

[0129]

| 缓冲液和 pH | pH | % 总 mAb1 (RP-HPLC) | % 天然 mAb1 (SE-HPLC) | % mAb1 聚集体 (SE-HPLC) | % mAb1 (CEX- HPLC) | | |
|---------------------|-----|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|------|------|
| | | | | | 酸性峰 | 主峰 | 碱性峰 |
| 起始材料 (无 45°C 孵育) | 5.3 | 100 | 97.8 | 1.2 | 17.6 | 68.2 | 13.2 |
| 无热稳定剂 | 5.4 | 106 | 91.9 | 5.8 | 28.1 | 56.5 | 15.4 |
| 8.5% 蔗糖 | 5.4 | 105 | 93.3 | 4.6 | 29.5 | 54.7 | 15.8 |
| 4.5%山梨醇 | 5.3 | 105 | 91.2 | 6.6 | 34.4 | 51.5 | 14.1 |
| 4.5%甘露醇 | 5.3 | 104 | 92.6 | 5.2 | 28.4 | 56.0 | 15.6 |
| 9.4%海藻糖二水 合物 | 5.4 | 103 | 93.4 | 4.5 | 29.1 | 55.6 | 15.3 |
| 2.2%甘氨酸 | 5.4 | 104 | 86.6 | 10.6 | 33.5 | 50.7 | 15.8 |
| 0.9% NaCl | 5.4 | 98 | 85.0 | 8.7 | 25.2 | 56.0 | 18.7 |
| 2.5%甘油 | 5.4 | 104 | 91.9 | 6.0 | 29.7 | 56.1 | 14.3 |
| 5%精氨酸 | 5.4 | 97 | 83.2 | 11.4 | 25.3 | 57.1 | 17.6 |

[0130] 实施例3.缓冲液和pH

[0131] 同样测定了pH和缓冲液种类对于mAb1稳定性的影响。将15mg/mL mAb1在不同缓冲液和pH 4.5-7.0的不同pH范围下孵育,通过SE-HPLC和阳离子交换HPLC (CEX-HPLC) 监测蛋白的稳定性。当mAb1在pH6.0时在组氨酸缓冲液中配制,或在pH5.3时在乙酸盐缓冲液中配制时,SE-HPLC和CEX-HPLC观察到最高的蛋白稳定性(表4和表5)。相对于含有组氨酸缓冲液的制剂,乙酸盐缓冲液提供了更宽的pH稳定性范围和更低的变体形成率(表5)。因此,选择pH5.3的乙酸盐缓冲液作为mAb1药物制剂的一部分。

[0132] 根据表4,将0.3ml 15mg/ml的mAb1、0.2%聚山梨酯20和10mM不同的缓冲液在2ml玻璃瓶中在约45°C保存约14天。通过在405nm处的光密度(OD) 确定浊度,记录为与起始材料相比在405nm处OD值的相对变化。所有样品的浊度可忽略不计。通过反相HPLC (RP-HPLC) 测定总的mAb1回收百分比。天然和聚集的mAb1的百分比通过尺寸排阻HPLC (SE-HPLC) 测定。酸性或碱性组分分别定义为从阳离子交换 (CEX-HPLC) 柱上洗脱下来的保留时间早于或晚于主峰的mAb1峰的总和。起始材料栏内的SE-HPLC结果是无热应激条件下各制剂的平均值。

[0133] 表4

[0134]

| 缓冲液和 pH | % 总 的 mAb1 回 收 率 (RP-HPLC) | %回收的 天 然 mAb1 (SE-HPL C) | %回收的 mAb1 聚集体 (SE-HPL C) | % 回收的 mAb1 ² (CEX-HPLC) | | |
|----------------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------|------|
| | | | | 酸性峰 | 主峰 | 碱性峰 |
| 起始材料 ³ (无 45°C 孵育) | 100 | 96.8 | 1.7 | 19.1 | 66.4 | 14.5 |
| pH 7.0, 磷酸盐 | 97 | 93.9 | 4.5 | 39.1 | 50.1 | 10.8 |
| pH 6.5, 磷酸盐 | 96 | 94.4 | 4.0 | 31.7 | 55.9 | 12.5 |
| pH 6.0, 磷酸盐 | 99 | 95.2 | 3.1 | 23.8 | 62.2 | 14.0 |
| pH 6.0, 组氨酸 | 97 | 95.5 | 2.8 | 23.9 | 61.8 | 14.3 |
| pH 6.0, 丁二酸盐 | 99 | 94.8 | 3.5 | 26.7 | 59.6 | 13.7 |
| pH 6.0, 柠檬酸盐 | 98 | 95.5 | 2.9 | 26.1 | 59.8 | 14.1 |
| pH 5.5, 柠檬酸盐 | 96 | 94.7 | 3.4 | 25.0 | 60.9 | 14.2 |
| pH 5.0, 柠檬酸盐 | 97 | 89.5 | 7.4 | 23.6 | 61.5 | 15.0 |
| pH 5.0, 乙酸盐 | 94 | 94.7 | 3.6 | 18.1 | 66.3 | 15.5 |
| pH 4.5, 乙酸盐 | 94 | 89.9 | 8.3 | 20.8 | 62.8 | 16.4 |

[0135] 根据表5,将0.3ml 15mg/ml的mAb1、0.2%聚山梨酯20和10mM不同的缓冲液在2ml玻璃瓶中在约45°C储存约14天。通过在405nm处的光密度(OD)确定浊度,记录为与起始材料相比在405nm处OD值的相对变化。所有样品的浊度可忽略不计。通过反相HPLC(RP-HPLC)测定总的mAb1回收百分比。天然和聚集的mAb1的百分比通过尺寸排阻HPLC(SE-HPLC)测定。酸性或碱性组分分别定义为从阳离子交换(CEX-HPLC)柱上洗脱下来的保留时间早于或晚于主峰的mAb1峰的总和。起始材料栏内的SE-HPLC结果是无热应激条件下各制剂的平均值。

[0136] 制剂开发研究表明,在碱性条件下(pH≥6.5),溶液中的mAb1可能脱去酰胺基。相反,在pH5.0以下,观察到形成mAb1分子量变体的比率增加。基于这些数据,mAb1制剂的pH维持在pH5.6和pH6.2之间。观察到mAb1在该pH范围内稳定。

[0137] 表5

[0138]

| 缓冲液和 pH | % 总 的 mAb1 回 收 率 (RP-HPLC) | % 回 收 的 天 然 mAb1 (SE-HPLC) | % 回 收 的 mAb1 聚集体 (SE-HPLC) | % 回收的天然 mAb1 (CEX-HPLC) | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------|------|
| | | | | 酸性峰 | 主峰 | 碱性峰 |
| 起始材料 ³ (无 45°C 孵育) | 100 | 96.5 | 2.1 | 18.7 | 66.7 | 14.6 |
| pH 5.5, 组氨酸 | 94 | 87.5 | 9.1 | 22.7 | 58.7 | 18.6 |
| pH 6.0, 组氨酸 | 100 | 96.6 | 2.4 | 22.7 | 63.0 | 14.2 |
| pH 6.5, 组氨酸 | 97 | 89.8 | 7.7 | 32.1 | 43.8 | 24.0 |
| pH 4.7, 乙酸盐 | 90 | 90.1 | 6.4 | 18.4 | 66.1 | 15.5 |
| pH 5.0, 乙酸盐 | 100 | 93.7 | 4.3 | 18.0 | 67.0 | 15.0 |
| pH 5.3, 乙酸盐 | 99 | 95.2 | 3.0 | 18.1 | 67.5 | 14.5 |
| pH 5.6, 乙酸盐 | 100 | 93.6 | 5.3 | 22.1 | 61.7 | 14.3 |

[0139] pH和缓冲液种类对于mAb1稳定性的影响进一步在含有20mM组氨酸(pH6)、12.5mM乙酸盐(pH5.3)、或20mM组氨酸和12.5mM乙酸盐的组合(pH5.9)的制剂中进行了评价(表6)。

与单独的缓冲系统相比, mAb1在含有组氨酸和乙酸盐的制剂 (pH5.9) 中最稳定。当mAb1在该组合缓冲系统中配制时, 可检测到最低的聚集率 (SE-HPLC) (表6)。

[0140] 表6

| 缓冲液和 pH | % 总的 mAb1 回收 率 (RP-HPLC) | % 回收的 天然 mAb1 (SE-HPLC) | % 回收的 mAb1 聚集体 (SE-HPLC) | % 回收的 mAb1 ² (CEX-HPLC) | | |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------|------|
| | | | | 酸性峰 | 主峰 | 碱性峰 |
| 起始材料 ³ (无 45°C 孵育) | 100 | 97.0 | 2.6 | 27.4 | 62.1 | 10.5 |
| 20 mM 组氨酸, pH 5.9 | 100 | 95.2 | 4.3 | 34.8 | 53.9 | 11.4 |
| 12.5 mM 乙酸盐, pH 5.3, | 103 | 94.8 | 4.8 | 30.9 | 56.0 | 13.1 |
| 组合的 20 mM 组氨 酸和 12.5 mM 乙酸 盐, pH 5.9 | 104 | 95.9 | 3.7 | 33.7 | 54.1 | 12.1 |

[0142] 根据表6, 将0.4ml 150mg/ml的mAb1、10%蔗糖、0.2%聚山梨酯20与不同的缓冲液在2ml玻璃瓶中在约45°C保存约14天。通过在405nm处的光密度 (OD) 确定浊度, 记录为与起始材料相比在405nm处OD值的相对变化。所有样品的浊度可忽略不计。通过反相HPLC (RP-HPLC) 测定总的mAb1回收百分比。天然和聚集的mAb1的百分比通过尺寸排阻HPLC (SE-HPLC) 测定。酸性或碱性组分分别定义为从阳离子交换 (CEX-HPLC) 柱上洗脱下来的保留时间早于或晚于主峰的mAb1峰的总和。起始材料栏内的SE-HPLC结果是无热应激条件下各制剂的平均值。

[0143] 实施例4. 粘度和张力的控制

[0144] 评价了高浓度的mAb1 (即150mg/ml、175mg/ml和200mg/ml) 和各种赋形剂的组合的粘度和张力 (以重量摩尔渗透压浓度表示)。调整蔗糖、氯化钠和L-精氨酸盐酸盐的量以获得含有高浓度mAb1的低粘度和生理张力的制剂, 从而能够方便、舒适和快速的进行皮下高剂量mAb1给药 (表7)。含有25mM精氨酸、20mM组氨酸、12.5mM乙酸盐、5% (w/v) 蔗糖、0.2% (w/v) 聚山梨酯20和150mg/mL mAb1的pH 5.9的液体制剂 (制剂A) 代表了具有低粘度 (约8.5厘泊) 和生理等渗 (约293mOsm/kg) 的最佳制剂, 其同时维持了mAb1的稳定性。

[0145] 表7

[0146]

| | mAb1 (mg/ml) | 组氨酸 (mM) | 乙酸盐 (mM) | 精氨酸 (mM) | NaCl (mM) | 蔗糖 (%w/v) | pH | 粘度 (厘泊) | 重量摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg) |
|---|-----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-----|------------|------------------------|
| A | 150 | 20 | 12.5 | 25 | 0 | 5 | 5.9 | 8.5 | 293 |
| B | 150 | 20 | 12.5 | 0 | 0 | 10 | 5.9 | 11 | 448 |
| C | 175 | 20 | 12.5 | 100 | 0 | 1 | 5.9 | ~8.0 | ~290 |
| D | 175 | 20 | 12.5 | 50 | 0 | 5 | 5.9 | ~9.5 | ~370 |
| E | 175 | 20 | 12.5 | 0 | 0 | 10 | 5.9 | ~20 | ~440 |
| F | 200 | 20 | 12.5 | 100 | 0 | 1 | 5.9 | ~15 | ~290 |
| G | 200 | 20 | 12.5 | 0 | 100 | 5 | 5.9 | ~19.2 | ~430 |
| H | 200 | 20 | 12.5 | 100 | 0 | 5 | 5.9 | ~17 | ~430 |
| I | 200 | 20 | 12.5 | 50 | 0 | 5 | 5.9 | ~18 | ~330 |
| J | 200 | 20 | 12.5 | 25 | 0 | 5 | 5.9 | ~23 | ~290 |
| K | 200 | 20 | 12.5 | 0 | 0 | 10 | 5.9 | ~35 | ~440 |

[0147] 实施例5. 制剂A的鉴定

[0148] 在开发mAb1液体制剂过程中, 鉴定的主要降解途径是聚集体、分解产物和电荷变体的形成。通过在含有25mM-精氨酸盐酸盐、20mM组氨酸、12.5mM乙酸盐、5%蔗糖、0.2%聚山梨酯20的pH5.9的制剂中配制mAb1, 这些降解产物的形成得以最小化。配制的150mg/mL mAb1经观察为透明至轻微乳白的液体制剂, 基本上不含可见颗粒。

[0149] 所配制的mAb1在不同的应激条件(25℃和45℃孵育)和实时储存条件(5℃)下是生理学和化学稳定的(表8)。当mAb1在25℃下孵育3个月或在5℃下储存6个月后, 其外观未受影响。此外, 未观察到溶液pH、浊度或回收的mAb1量的改变。所配制的mAb1在25℃下孵育3个月后, 经SE-HPLC测定所述抗体未显著降解, 经CEX-HPLC测定3.3%被降解。经SE-HPLC和CEX-HPLC测定, 在45℃孵育8周后, 降解增加, 表明聚集体和电荷变体形式是mAb1抗体分子的主要降解途径。当所配制的mAb1抗体在5℃下储存6个月后, 未观察到降解。

[0150] 表8

[0151]

| 应激测试 | | 未储存 | 5℃ | | | 25℃ | |
|---------------------|----|------|------|------|------|------|------|
| 储存周期 | | - | 2个月 | 3个月 | 6个月 | 1个月 | 3个月 |
| 目视外观 | | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 |
| 浊度(OD 405 nm) | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 |
| pH | | 6.0 | 6.0 | 5.9 | 5.9 | 6.0 | 6.0 |
| % mAb1 (RP-HPLC) | | 100 | 97 | 104 | | 97 | 102 |
| % 天然 mAb1 (SE-HPLC) | | 98.1 | 98.2 | 98.2 | | 98.1 | 97.8 |
| % mAb1 (CEX-HPLC 峰) | 酸性 | 14.6 | 14.7 | 14.7 | | 16.0 | 17.6 |
| | 主峰 | 70.7 | 70.5 | 70.4 | | 69.8 | 67.4 |
| | 碱性 | 14.7 | 14.8 | 14.9 | | 14.3 | 15.0 |

[0152]

| 应激测试 | | 未储存 | 45°C | | |
|------------------------|----|------|------|------|------|
| 储存周期 | | - | 2 周 | 4 周 | 8 周 |
| 目视外观 | | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 |
| 浊度(OD 405 nm) | | 0.00 | 0.02 | 0.03 | 0.05 |
| pH | | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| % mAb1 (RP-HPLC) | | 100 | 102 | 98 | 100 |
| % 天然 mAb1 (SE-HPLC) | | 98.1 | 95.9 | 94.2 | 90.5 |
| % mAb1 (CEX-HPLC 峰) | 酸性 | 14.6 | 20.8 | 29.9 | 44.0 |
| | 主峰 | 70.7 | 64.5 | 56.7 | 45.1 |
| | 碱性 | 14.7 | 14.7 | 13.4 | 10.9 |

[0153] 根据表8, OD=光密度; RP-HPLC=反相高效液相色谱; SE-HPLC=尺寸排阻高效液相色谱; 以及CEX-HPLC=阳离子交换高效液相色谱。酸性或碱性组分分别定义为从CEX-HPLC柱上洗脱下来的保留时间早于或晚于主峰的mAb1峰的总和。

[0154] 实施例6. 容器

[0155] 含有mAb1的制剂已确定在无菌过滤时是稳定的。使用Millipore MILLIPAK过滤单元制备临床材料, 研究中也使用相同构成的滤器(Millipore Millex Durapore)。

[0156] 在5-mL玻璃小瓶中装入最小量的2.5mL 150mg/mL mAb1、5% (w/v) 蔗糖、25mM L-精氨酸盐酸盐、0.2% (w/v) 聚山梨酯20、12.5mM乙酸盐、20mM组氨酸(pH 5.9)。在该5-mL小瓶中多装入0.5mL制剂, 以保证可以抽取2.0mL制剂。该过量并非是为了补偿mAb1或含有mAb1的制剂在生产过程中的损失、生产过程中的降解、在储存过程(贮存期限)中的降解或延长有效期。

[0157] 与储存在玻璃瓶中相比, mAb1制剂(制剂A)的稳定性并没有因为储存在聚丙烯管、聚苯乙烯管、聚碳酸酯管或含有不锈钢片的玻璃管中而受到影响(表9)。

[0158] 表9

[0159]

| 储存温度 | | 未储存 | 40°C 下 14 天 | | | | |
|---------------------|----|------|-------------|------|------|------|------|
| 储存容器 | | 玻璃 | 玻璃 | 聚丙烯 | 聚苯乙烯 | 聚碳酸酯 | 不锈钢 |
| 目视外观 | | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 |
| 浊度(OD 405 nm) | | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.01 |
| pH | | 5.9 | 5.9 | 5.7 | 5.8 | 5.8 | 5.9 |
| % mAb1 (RP-HPLC) | | 100 | 102 | 103 | 107 | 106 | 102 |
| % 天然 mAb1 (SE-HPLC) | | 98.4 | 97.6 | 97.4 | 97.5 | 97.5 | 96.1 |
| % mAb1 峰 (CEX-HPLC) | 酸性 | 14.8 | 18.4 | 19.1 | 18.4 | 18.4 | 20.3 |
| | 主峰 | 70.7 | 65.8 | 65.5 | 66.0 | 66.5 | 65.0 |
| | 碱性 | 14.5 | 15.8 | 15.3 | 15.6 | 15.1 | 14.7 |

[0160] 根据表9, 将150mg/mL mAb1、5% 蔗糖、25mM精氨酸盐酸盐、0.2% PS-20、20mM组氨酸和12.5mM乙酸盐(pH 5.9)与不同的材料在40°C孵育14天。OD=光密度; RP-HPLC=反相高效液相色谱; SE-HPLC=尺寸排阻高效液相色谱; 以及CEX-HPLC=阳离子交换高效液相色谱。通过与起始材料相比在405nm处OD值的相对变化确定浊度。酸性或碱性组分分别定义为

从CEX-HPLC柱上洗脱下来的保留时间早于或晚于主峰的mAb1峰的总和。

<110> 瑞恩泽制药公司

<120> 含有抗白介素-4受体(IL-4R)的抗体的稳定制剂

<130> 6032

<160> 26

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0001]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Leu Ser Ile Thr Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Gly Leu
100 105 110

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

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr Ala
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Ala Lys Asp Arg Leu Ser Ile Thr Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Gly Leu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 112
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ile Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

[0002]

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 6

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ile Gly Tyr Asn Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

Leu Gly Ser
1

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 8

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 9

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

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

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

Ser Gly Leu Ser Arg Thr Ser Val Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Trp Gly Thr Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

[0003] Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 11

Leu Ser Arg Thr Ser Val Ser Ile
 1 5

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12

Ala Lys Trp Gly Thr Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 13

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ile Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Asn Val Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

[0004]

<210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 14
 Gln Asp Ile Ser Ile Trp
 1 5
 <210> 15
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 15
 Val Ala Ser
 1
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 16
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 17
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 17
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Ser Leu Arg | Leu Ser Cys Ala Ala | Ser Gly Phe Thr Phe | Arg Ser Tyr |
| | 20 | 25 | 30 |
| Gly Met His | Trp Val Arg Gln Ala | Pro Gly Lys Gly | Leu Glu Trp Val |
| | 35 | 40 | 45 |
| Ala Val Ile | Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys | Tyr Tyr Ile Asp | Ser Val |
| | 50 | 55 | 60 |
| Lys Gly Arg Phe Thr | Ile Ser Arg Asp Asn | Ser Lys Asn Thr | Leu Asn |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Leu Gln Met Asn | Ser Leu Arg Leu Glu Asp | Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Ala Lys Glu Gly Arg Gly Gly Phe | Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Val Thr Val Ser Ser | | | |
| | 115 | | |
| <210> | 18 | | |
| <211> | 8 | | |
| <212> | PRT | | |
| <213> | 人 | | |
| [0005] <400> | 18 | | |
| Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly | | | |
| 1 | 5 | | |
| <210> | 19 | | |
| <211> | 8 | | |
| <212> | PRT | | |
| <213> | 人 | | |
| <400> | 19 | | |
| Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys | | | |
| 1 | 5 | | |
| <210> | 20 | | |
| <211> | 10 | | |
| <212> | PRT | | |
| <213> | 人 | | |
| <400> | 20 | | |
| Ala Lys Glu Gly Arg Gly Gly Phe Asp Tyr | | | |
| 1 | 5 | 10 | |
| <210> | 21 | | |
| <211> | 107 | | |
| <212> | PRT | | |
| <213> | 人 | | |
| <400> | 21 | | |
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

His Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys 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 Asn Ser His Pro Trp
85 90 95

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

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 22

Gln Val Ile Asn Asn Tyr
1 5

[0006]

<210> 23
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 23

Ala Ala Ser
1

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 24

Gln Gln Tyr Asn Ser His Pro Trp Thr
1 5

<210> 25
<211> 825
<212> PRT
<213> 人

<400> 25

Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val
1 5 10 15

Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro
20 25 30

Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met
35 40 45

[0007]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Gly | Pro | Thr | Asn | Cys | Ser | Thr | Glu | Leu | Arg | Leu | Leu | Tyr | Gln | Leu | 50 | 55 | 60 | |
| Val | Phe | Leu | Leu | Ser | Glu | Ala | His | Thr | Cys | Ile | Pro | Glu | Asn | Asn | Gly | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Gly | Ala | Gly | Cys | Val | Cys | His | Leu | Leu | Met | Asp | Asp | Val | Val | Ser | Ala | 85 | 90 | 95 | |
| Asp | Asn | Tyr | Thr | Leu | Asp | Leu | Trp | Ala | Gly | Gln | Gln | Leu | Leu | Trp | Lys | 100 | 105 | 110 | |
| Gly | Ser | Phe | Lys | Pro | Ser | Glu | His | Val | Lys | Pro | Arg | Ala | Pro | Gly | Asn | 115 | 120 | 125 | |
| Leu | Thr | Val | His | Thr | Asn | Val | Ser | Asp | Thr | Leu | Leu | Leu | Thr | Trp | Ser | 130 | 135 | 140 | |
| Asn | Pro | Tyr | Pro | Pro | Asp | Asn | Tyr | Leu | Tyr | Asn | His | Leu | Thr | Tyr | Ala | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val | Asn | Ile | Trp | Ser | Glu | Asn | Asp | Pro | Ala | Asp | Phe | Arg | Ile | Tyr | Asn | 165 | 170 | 175 | |
| Val | Thr | Tyr | Leu | Glu | Pro | Ser | Leu | Arg | Ile | Ala | Ala | Ser | Thr | Leu | Lys | 180 | 185 | 190 | |
| Ser | Gly | Ile | Ser | Tyr | Arg | Ala | Arg | Val | Arg | Ala | Trp | Ala | Gln | Cys | Tyr | 195 | 200 | 205 | |
| Asn | Thr | Thr | Trp | Ser | Glu | Trp | Ser | Pro | Ser | Thr | Lys | Trp | His | Asn | Ser | 210 | 215 | 220 | |
| Tyr | Arg | Glu | Pro | Phe | Glu | Gln | His | Leu | Leu | Leu | Gly | Val | Ser | Val | Ser | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Cys | Ile | Val | Ile | Leu | Ala | Val | Cys | Leu | Leu | Cys | Tyr | Val | Ser | Ile | Thr | 245 | 250 | 255 | |
| Lys | Ile | Lys | Lys | Glu | Trp | Trp | Asp | Gln | Ile | Pro | Asn | Pro | Ala | Arg | Ser | 260 | 265 | 270 | |
| Arg | Leu | Val | Ala | Ile | Ile | Ile | Gln | Asp | Ala | Gln | Gly | Ser | Gln | Trp | Glu | 275 | 280 | 285 | |
| Lys | Arg | Ser | Arg | Gly | Gln | Glu | Pro | Ala | Lys | Cys | Pro | His | Trp | Lys | Asn | 290 | 295 | 300 | |
| Cys | Leu | Thr | Lys | Leu | Leu | Pro | Cys | Phe | Leu | Glu | His | Asn | Met | Lys | Arg | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Asp | Glu | Asp | Pro | His | Lys | Ala | Ala | Lys | Glu | Met | Pro | Phe | Gln | Gly | Ser | 325 | 330 | 335 | |
| Gly | Lys | Ser | Ala | Trp | Cys | Pro | Val | Glu | Ile | Ser | Lys | Thr | Val | Leu | Trp | 340 | 345 | 350 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Pro | Glu | Ser | Ile | Ser | Val | Val | Arg | Cys | Val | Glu | Leu | Phe | Glu | Ala | Pro | |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| | Val | Glu | Cys | Glu | Glu | Glu | Glu | Glu | Val | Glu | Glu | Glu | Lys | Gly | Ser | Phe | |
| | | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| | Cys | Ala | Ser | Pro | Glu | Ser | Ser | Arg | Asp | Asp | Phe | Gln | Glu | Gly | Arg | Ala | |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| | Gly | Ile | Val | Ala | Arg | Leu | Thr | Glu | Ser | Leu | Phe | Leu | Asp | Leu | Leu | Gly | |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| | Glu | Glu | Asn | Gly | Gly | Phe | Cys | Gln | Gln | Asp | Met | Gly | Glu | Ser | Arg | Leu | |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| | Leu | Pro | Pro | Ser | Gly | Ser | Thr | Ser | Ala | His | Met | Pro | Trp | Asp | Glu | Phe | |
| | | 435 | | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| | Pro | Ser | Ala | Gly | Pro | Lys | Glu | Ala | Pro | Pro | Trp | Gly | Lys | Glu | Gln | Pro | |
| | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |
| | Leu | His | Leu | Glu | Pro | Ser | Pro | Pro | Ala | Ser | Pro | Thr | Gln | Ser | Pro | Asp | |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | |
| | Asn | Leu | Thr | Cys | Thr | Glu | Thr | Pro | Leu | Val | Ile | Ala | Gly | Asn | Pro | Ala | |
| | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | |
| [0008] | Tyr | Arg | Ser | Phe | Ser | Asn | Pro | Leu | Ser | Gln | Ser | Pro | Cys | Pro | Arg | Glu | |
| | | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| | Leu | Gly | Pro | Asp | Pro | Leu | Leu | Ala | Arg | His | Leu | Glu | Glu | Val | Glu | Pro | |
| | | 515 | | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | |
| | Glu | Met | Pro | Cys | Val | Pro | Gln | Leu | Ser | Glu | Pro | Thr | Thr | Val | Pro | Gln | |
| | | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | |
| | Pro | Glu | Pro | Glu | Thr | Trp | Glu | Gln | Ile | Leu | Arg | Arg | Asn | Val | Leu | Gln | |
| | 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | |
| | His | Gly | Ala | Ala | Ala | Ala | Pro | Val | Ser | Ala | Pro | Thr | Ser | Gly | Tyr | Arg | |
| | | | | 565 | | | | | | 570 | | | | | 575 | | |
| | Glu | Phe | Val | His | Ala | Val | Glu | Gln | Gly | Gly | Thr | Gln | Ala | Ser | Ala | Val | |
| | | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | | |
| | Val | Gly | Leu | Gly | Pro | Pro | Gly | Glu | Ala | Gly | Tyr | Lys | Ala | Phe | Ser | Ser | |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | | 605 | | | | |
| | Leu | Leu | Ala | Ser | Ser | Ala | Val | Ser | Pro | Glu | Lys | Cys | Gly | Phe | Gly | Ala | |
| | | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | |
| | Ser | Ser | Gly | Glu | Glu | Gly | Tyr | Lys | Pro | Phe | Gln | Asp | Leu | Ile | Pro | Gly | |
| | 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 | |
| | Cys | Pro | Gly | Asp | Pro | Ala | Pro | Val | Pro | Val | Pro | Leu | Phe | Thr | Phe | Gly | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 645 | | | | | | | | | | 650 | | | | | 655 | | | | |
| Leu | Asp | Arg | Glu | Pro | Pro | Arg | Ser | Pro | Gln | Ser | Ser | His | Leu | Pro | Ser | | | | |
| | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | | | | | |
| Ser | Ser | Pro | Glu | His | Leu | Gly | Leu | Glu | Pro | Gly | Glu | Lys | Val | Glu | Asp | | | | |
| | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | | | | | |
| Met | Pro | Lys | Pro | Pro | Leu | Pro | Gln | Glu | Gln | Ala | Thr | Asp | Pro | Leu | Val | | | | |
| | | 690 | | | | 695 | | | | | 700 | | | | | | | | |
| Asp | Ser | Leu | Gly | Ser | Gly | Ile | Val | Tyr | Ser | Ala | Leu | Thr | Cys | His | Leu | | | | |
| 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 | | | | |
| Cys | Gly | His | Leu | Lys | Gln | Cys | His | Gly | Gln | Glu | Asp | Gly | Gly | Gln | Thr | | | | |
| | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | | | | | |
| Pro | Val | Met | Ala | Ser | Pro | Cys | Cys | Gly | Cys | Cys | Cys | Gly | Asp | Arg | Ser | | | | |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | | | | | |
| Ser | Pro | Pro | Thr | Thr | Pro | Leu | Arg | Ala | Pro | Asp | Pro | Ser | Pro | Gly | Gly | | | | |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | | | | | |
| Val | Pro | Leu | Glu | Ala | Ser | Leu | Cys | Pro | Ala | Ser | Leu | Ala | Pro | Ser | Gly | | | | |
| | | 770 | | | | 775 | | | | | 780 | | | | | | | | |
| Ile | Ser | Glu | Lys | Ser | Lys | Ser | Ser | Ser | Ser | Phe | His | Pro | Ala | Pro | Gly | | | | |
| 785 | | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 | | | | |
| Asn | Ala | Gln | Ser | Ser | Ser | Gln | Thr | Pro | Lys | Ile | Val | Asn | Phe | Val | Ser | | | | |
| | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | 815 | | | | | |
| Val | Gly | Pro | Thr | Tyr | Met | Arg | Val | Ser | | | | | | | | | | | |
| | | | 820 | | | | | 825 | | | | | | | | | | | |
| <210> | 26 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <211> | 207 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <213> | 人 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <400> | 26 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Lys | Val | Leu | Gln | Glu | Pro | Thr | Cys | Val | Ser | Asp | Tyr | Met | Ser | Ile | | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | | | |
| Ser | Thr | Cys | Glu | Trp | Lys | Met | Asn | Gly | Pro | Thr | Asn | Cys | Ser | Thr | Glu | | | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | | | |
| Leu | Arg | Leu | Leu | Tyr | Gln | Leu | Val | Phe | Leu | Leu | Ser | Glu | Ala | His | Thr | | | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | | |
| Cys | Ile | Pro | Glu | Asn | Asn | Gly | Gly | Ala | Gly | Cys | Val | Cys | His | Leu | Leu | | | | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | |
| Met | Asp | Asp | Val | Val | Ser | Ala | Asp | Asn | Tyr | Thr | Leu | Asp | Leu | Trp | Ala | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | |
| Gly | Gln | Gln | Leu | Leu | Trp | Lys | Gly | Ser | Phe | Lys | Pro | Ser | Glu | His | Val | | | | |

[0010]

| | 85 | | | | | | | 90 | | | | | | 95 | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Pro | Arg | Ala | Pro | Gly | Asn | Leu | Thr | Val | His | Thr | Asn | Val | Ser | Asp |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Thr | Leu | Leu | Leu | Thr | Trp | Ser | Asn | Pro | Tyr | Pro | Pro | Asp | Asn | Tyr | Leu |
| | | | 115 | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Tyr | Asn | His | Leu | Thr | Tyr | Ala | Val | Asn | Ile | Trp | Ser | Glu | Asn | Asp | Pro |
| | | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | |
| Ala | Asp | Phe | Arg | Ile | Tyr | Asn | Val | Thr | Tyr | Leu | Glu | Pro | Ser | Leu | Arg |
| | | | | | | 150 | | | | 155 | | | | | 160 |
| Ile | Ala | Ala | Ser | Thr | Leu | Lys | Ser | Gly | Ile | Ser | Tyr | Arg | Ala | Arg | Val |
| | | | | | 165 | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Arg | Ala | Trp | Ala | Gln | Cys | Tyr | Asn | Thr | Thr | Trp | Ser | Glu | Trp | Ser | Pro |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Ser | Thr | Lys | Trp | His | Asn | Ser | Tyr | Arg | Glu | Pro | Phe | Glu | Gln | His | |
| | | | 195 | | | | 200 | | | | | 205 | | | |