



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114786719 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 22

(21) 申请号 202080082579.4

(22) 申请日 2020.10.02

(30) 优先权数据

62/909,267 2019.10.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.05.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/054036 2020.10.02

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/067775 EN 2021.04.08

(71) 申请人 阿拉玛布治疗学股份有限公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 张彦丰

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 陈扬扬 钱文字

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/22 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

权利要求书2页 说明书53页

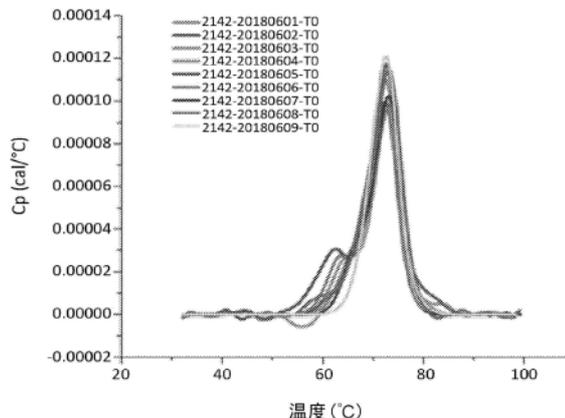
序列表24页 附图16页

(54) 发明名称

抗-连接蛋白抗体制剂

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗与骨细胞中Cx43半通道开放不足有关的疾病或病症的药物组合物和方法,优选地用于治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松症或骨质减少。



1. 一种药物制剂,其包含:
一种抗-Cx43抗体或其抗原结合片段;
缓冲液;
表面活性剂;和
稳定剂;
其中所述药物制剂pH为约5至约6;
其中所述抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包含:
分别具有SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列的第一、第二和第三重链互补决定区(CDR)序列;和
分别具有SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列的第一、第二和第三轻链CDR序列。
2. 如权利要求1所述的药物制剂,其中所述抗Cx43抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中所述重链可变结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:7,和所述轻链可变结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:8。
3. 如权利要求2所述的药物制剂,其中所述抗Cx43抗体或其抗原结合片段包括重链,其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的药物制剂,其中所述抗Cx43抗体或其抗原结合片段结合至位于FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列内的表位。
5. 如权利要求4所述的药物制剂,其中所述表位包含选自下组的一个或多个氨基酸:SEQ ID NO:19的F1、S3、R4、P5、T6、E7、K8、T9和I10,或由SEQ ID NO:19的F1、S3、R4、P5、T6、E7、K8、T9和I10组成。
6. 如权利要求4所述的药物制剂,其中所述表位包含SEQ ID NO:19的所有十个氨基酸,或由SEQ ID NO:19的所有十个氨基酸组成。
7. 如权利要求1-3和5-6中任一项所述的药物制剂,其中所述抗Cx43抗体或其抗原结合片段是以约5至约50mg/mL、或约10至约40mg/mL、或约15至约30mg/mL的浓度存在。
8. 如权利要求1-3和5-6中任一项所述的药物制剂,其中所述缓冲液选自乙酸/乙酸钠、组氨酸/天冬氨酸、柠檬酸/柠檬酸钠、磷酸氢二钠/磷酸二氢钠和组氨酸/组氨酸盐酸盐。
9. 如权利要求8所述的药物制剂,其中所述缓冲液是组氨酸/天冬氨酸或组氨酸/组氨酸盐酸盐。
10. 如权利要求9所述的药物制剂,其中所述缓冲液是组氨酸/组氨酸盐酸盐。
11. 如权利要求1-3、5-6和8-9中任一项所述的药物制剂,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80 (PS80)。
12. 如权利要求1-3、5-6和8-9中任一项所述的药物制剂,其中所述稳定剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)、氯化钠、山梨糖醇、甘氨酸和蔗糖。
13. 如权利要求12所述的药物制剂,其中所述稳定剂是蔗糖。
14. 如权利要求1-3、5-6、8-9和13中任一项所述的药物制剂,其中所述pH为约5.4至约5.6。
15. 如权利要求1-3、5-6、8-9和13中任一项所述的药物制剂,其中所述制剂是水性制剂。
16. 一种药物制剂,其包含:

约10-50mg/mL或约25mg/mL的抗Cx43抗体或其抗原结合片段,其结合至位于FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列内的表位;

约10-40mM、或约20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液;

约0.005%-0.05%,或约0.02%w/v聚山梨醇酯80;和

约1%-20%w/v,或约8%w/v蔗糖;

其中所述制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

17. 一种药物制剂,其包含:

约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;

约20mM组氨酸/天冬氨酸缓冲液;

约0.02%w/v聚山梨醇酯80;和

约8%w/v蔗糖,

其中所述制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

18. 如权利要求1、16和17中任一项所述的药物制剂,用于促进骨细胞中Cx43半通道开放,且任选地用于治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松或骨质减少。

19. 如权利要求1、16和17中任一项所述的药物制剂的用途,用于促进骨细胞中Cx43半通道开放,任选地用于治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松或骨质减少。

抗-连接蛋白抗体制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年10月2日提交的美国临时专利申请第62/909,267号的优先权和权益,其公开通过引用全文纳入本文。

[0003] 序列表

[0004] 通过EFS-Web在2020年10月2日创建的名为“172628_020501_sequence.txt”的具有43,785字节大小的ASCII文本文件通过引用其全部内容纳入本文。

技术领域

[0005] 本公开总体上涉及包含抗-连接蛋白(Cx)43抗体的稳定的水性药物组合物。

背景技术

[0006] 由于其靶识别的特异性,抗体已经被用于治疗多种疾病和病症,从而在全身给药后产生高度选择性的转归。为了使抗体保持有效,它们必须在生产、纯化、运输和储存过程中保持其生物活性。已经开发了新的生产和纯化技术以提供大量的要生产的高度纯化的单克隆抗体。然而,仍然存在稳定这些抗体用于运输和储存的挑战,而以适合给药的剂型提供抗体则存在更多挑战。

[0007] 变性、聚集、污染和颗粒形成可能是抗体配制和储存中的重大障碍。由于抗体种类繁多,因此没有适合储存所有抗体的通用制剂或条件。适合储存一种抗体的最佳制剂和条件通常是该抗体特定的。因此,抗体储存制剂和方法通常是市售抗体研发过程的重要部分。

[0008] 已经提出了各种方法来克服与抗体稳定性相关的挑战。例如,在某些情况下,抗体通常被冻干,然后在给药前不久重建。然而,重建通常并不理想,因为它在给药过程中增加了一个额外的步骤,并且可能将污染物引入制剂中。此外,即使是重建的抗体也会发生聚集和颗粒形成。因此,需要提供稳定的水性抗体制剂,特别是能够克服与运输和储存相关的挑战的抗Cx43抗体制剂。

发明内容

[0009] 本发明提供,在一方面,药物制剂,其包括:

[0010] 一种抗-Cx43抗体或其抗原结合片段:

[0011] 缓冲液;

[0012] 表面活性剂;和

[0013] 稳定剂;

[0014] 其中所述药物制剂pH为约5至约6;

[0015] 其中所述抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包含:

[0016] 分别具有SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列的第一、第二和第三重链互补决定区(CDR)序列;和

[0017] 分别具有SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列的第一、第二和第三轻链CDR序列。

[0018] 在一些实施方式中,抗Cx43抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中所述重链可变结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:7,和所述轻链可变结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0019] 在某些实施方式中,抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0020] 在某些实施方式中,抗Cx43抗体或其抗原结合片段结合至位于FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列内的表位。在一些实施方式中,表位可包含一个或多个氨基酸,其选自下组:SEQ ID NO:19的F1、S3、R4、P5、T6、E7、K8、T9和I10。在一个实施方式中,表位由SEQ ID NO:19的F1、S3、R4、P5、T6、E7、K8、T9和I10组成。在一些实施方式中,表位可包括SEQ ID NO:19的全部10个氨基酸。在一些实施方式中,表位可由SEQ ID NO:19的全部10个氨基酸组成。

[0021] 在一些实施方式中,抗-Cx43抗体或其抗原结合片段是以约5至约50mg/mL的浓度存在,任选地,10至40mg/mL,或约15至30mg/mL。

[0022] 在一些实施方式中,缓冲液选自乙酸/乙酸钠、组氨酸/天冬氨酸、柠檬酸/柠檬酸钠、磷酸氢二钠(dibasic sodium phosphate)/磷酸二氢钠和组氨酸/组氨酸盐酸盐。在某些实施方式中,缓冲液是组氨酸/天冬氨酸或组氨酸/组氨酸盐酸盐。在某些实施方式中,缓冲液是组氨酸/组氨酸盐酸盐。

[0023] 在一些实施方式中,表面活性剂是聚山梨醇酯80(PS80)。

[0024] 在某些实施方式中,稳定剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)、氯化钠、山梨糖醇、甘氨酸和蔗糖。在某些实施方式中,稳定剂是蔗糖。

[0025] 在某些实施方式中,制剂的pH为约5.4至约5.6。

[0026] 在一些实施方式中,制剂是水性制剂。在一些实施方式中,制剂是稳定的水性制剂。

[0027] 另一方面涉及药物制剂,其包括:

[0028] 约10-50mg/mL或约25mg/mL的抗Cx43抗体或其抗原结合片段(例如,那些结合至位于FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列内表位的);

[0029] 约10-40mM、或约20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液;

[0030] 约0.005%-0.05%,或约0.02%w/v聚山梨醇酯80;和

[0031] 约1%-20%w/v,或约8%w/v蔗糖;

[0032] 其中所述制剂pH为约5至约6,或约5.4至约5.6,或约5.5。

[0033] 另一方面涉及药物制剂,其包括:

[0034] 约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;

[0035] 约20mM组氨酸/天冬氨酸缓冲液;

[0036] 约0.02%w/v聚山梨醇酯80;和

[0037] 约8%w/v蔗糖,

[0038] 其中所述制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0039] 本文还提供了本文所述药物制剂的用途,用于促进骨细胞中Cx43半通道开放,例如用于治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松或骨质减少。还提供了用于治疗受骨细胞中

Cx43半通道的开放(或开放不足)影响的疾病的方法和试剂盒。

附图说明

- [0040] 图1:来自抗-Cx43 Ab pH/缓冲液筛选研究的MicroCal DSC热分析图(thermogram)覆盖。
- [0041] 图2:来自pH/缓冲液筛选研究的SEC-主峰%比较,在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (左)和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (右)。
- [0042] 图3:来自pH/缓冲液筛选研究的cIEF主峰%比较,在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (左)和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (右)。
- [0043] 图4:来自pH/缓冲液筛选研究的非还原SDS-卡尺纯度(Caliper purity)%比较,在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (左)和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (右)。
- [0044] 图5:来自pH/缓冲液筛选研究的还原SDS-卡尺纯度(Caliper purity)%比较,在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (左)和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (右)。
- [0045] 图6:来自冷冻/解冻研究的SEC-HPLC主峰%比较。
- [0046] 图7:来自冷冻/解冻研究的cIEF主峰%比较。
- [0047] 图8:在非还原SDS-卡尺(左)和还原SDS-卡尺(右)中来自冷冻/解冻研究的纯度%比较。
- [0048] 图9:来自搅拌研究的SEC-HPLC主峰%比较。
- [0049] 图10:来自搅拌研究的cIEF主峰%比较。
- [0050] 图11:在非还原SDS-卡尺(左)和还原SDS-卡尺(右)中来自搅拌研究的纯度%比较。
- [0051] 图12:SEC-主峰%比较,在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ (左)、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (中)和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (右)。
- [0052] 图13:cIEF主峰%比较,在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ (左)、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (中)和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (右)。
- [0053] 图14:非还原SDS-卡尺纯度%比较,在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ (左)、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (中)和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (右)。
- [0054] 图15:还原SDS-卡尺纯度%比较,在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ (左)、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (中)和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (右)。
- [0055] 图16:来自抗-Cx43 Ab制剂确认研究的MicroCal DSC热分析图覆盖。
- [0056] 发明详述
- [0057] 在一些实施方式中,本文公开的是抗Cx43抗体的稳定的水性药物制剂。这种制剂可以包括:抗-Cx43抗体或其抗原结合片段、缓冲液、表面活性剂和稳定剂。药物制剂的pH可以是约5至约6,或约5.4-5.6,或约5.5。
- [0058] 在一些实施方式中,抗Cx43抗体或其抗原结合片段可以具有第一、第二和第三重链互补决定区(CDR)序列,其分别具有SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列;和/或第一、第二和第三轻链CDR序列,分别具有SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列。
- [0059] 在一些实施方式中,抗Cx43抗体或其抗原结合片段可以具有重链可变结构域和轻链可变结构域,其中所述重链可变结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:7,和所述轻链可变结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:8。
- [0060] 在某些实施方式中,抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。
- [0061] 在某些实施方式中,抗Cx43抗体或其抗原结合片段结合至位于FLSRPTEKTI(SEQ ID NO:19)的氨基酸序列内的表位。
- [0062] 在多种实施方式中,本文公开的制剂可以具有改进的稳定性,以使其在预定温度

(例如, -20℃或2-8℃的冷藏温度)持续一段时间(例如,至少3个月、至少6个月、至少1年或长达2年)观察无显著变化(例如外观、抗体浓度、pH、抗体聚集和抗体纯度)。

[0063] 定义

[0064] 除非另外定义,否则,本文中所使用的所有技术和科学术语都具有本文所适用领域普通技术人员通常所理解的含义。以下参考文献为技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:《学术出版社科学与技术词典》(Academic Press Dictionary of Science and Technology),Morris(编),学术出版社(Academic Press)(第1版,1992);《牛津生物化学和分子生物学词典》(Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology),Smith等(编),牛津大学出版社(Oxford University Press)(修订版,2000);《化学百科全书词典》(Encyclopaedic Dictionary of Chemistry),Kumar(编),Anmol出版公司(Anmol Publications Pvt.Ltd.)(2002);《微生物和分子生物学词典》(Dictionary of Microbiology and Molecular Biology),Singleton等(编),John Wiley和Sons(第3版,2002);《化学词典》(Dictionary of Chemistry),Hunt(编),Routledge(第1版,1999);《制药医学词典》(Dictionary of Pharmaceutical Medicine),Nahler(编),Springer-Verlag Telos(1994);《有机化学词典》(Dictionary of Organic Chemistry),Kumar和Anandand(编),Anmol出版公司(2002);和《生物学词典》(A Dictionary of Biology)(牛津平装书参考(Oxford Paperback Reference)),Martin和Hine(编),牛津大学出版社(第4版,2000)。本文还提供了一些这些术语特定地应用于本发明的进一步阐明。

[0065] 本文使用冠词“一个”和“一种”表示一个或多个的(即至少一个)该冠词语法上的宾语。术语“一种”或“一个”当与“包含”在本文中联用时,可表示“一个”,但也与“一个或多个”,“至少一个”和“一个或多个”的意思一致。

[0066] 如本文所用,“约”和“近似”通常表示在考虑测量的性质或精度的情况下测量的量的可接受的误差度。示例性误差度在给定数值范围的20%以内,通常在10%以内,更通常在5%以内。术语“基本(上)”表示超过50%,更优选超过80%并且最优选超过90%或95%。

[0067] 如本文所用,术语“包含”或“包括”是针对存在于给定实施方式中的组合物、方法及其一种或多种各自的组分来使用的,为开放式,可包含未指定要素。

[0068] 如本文所用,术语“基本上由.....组成”是指给定实施方式所需的那些要素。该术语允许存在实质上不影响本公开的该实施方式的基本和新颖的或功能的一个或多个特征的附加要素。

[0069] 术语“由.....组成”指本文所述的组合物、方法及其各自的组分,其排除了在该实施方式的描述中未列举的任何要素。

[0070] “抗Cx43抗体”是免疫特异性结合至Cx43(例如,其胞外结构域)的抗体。抗体可以是分离的抗体。与Cx43的这种结合显示例如不大于1 μ M,不大于100nM或不大于50nM的 K_D 值。可用本领域技术人员已知的任何方法测定 K_D ,例如表面等离子体共振实验或细胞结合实验。抗Cx43抗体可以是单克隆抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,所述抗体可以是国际申请号PCT/US2019/025363中描述的那些,其通过引用整体纳入本文。

[0071] 如本文所用,“抗体”是包含结合靶表位的结合结构域的蛋白质。术语抗体包括单克隆抗体,所述单克隆抗体包括免疫球蛋白重链和轻链分子,单重链可变域抗体,和其变体和衍生物,包括单克隆和单重链可变结构域抗体的嵌合变体。结合域基本上由免疫球蛋白

基因或免疫球蛋白基因片段编码,其中蛋白质免疫特异性结合抗原。已被识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及大量免疫球蛋白可变区基因。轻链被归类为 κ 或 λ 。重链被归类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,这进而确定了免疫球蛋白类别,分别为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。对于包括人类和鼠类在内的大多数脊椎动物生物体,典型的免疫球蛋白结构单元包含一个由两对相同的多肽链组成的四聚体,每对具有一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。“V_L”和“V_H”分别指这些轻链和重链的可变结构域。“C_L”和“C_H”分别指这些轻链和重链的恒定结构域。V_L和V_H上各三个 β 链环负责与抗原结合,被称为“互补决定区”或“CDR”。“Fab”(抗原结合片段)区包括来自抗体的每条重链和轻链的一个恒定区和一个多变区即V_L,C_L,V_H和C_H1。

[0072] 抗体包括完整的免疫球蛋白及其抗原结合片段。术语“抗原结合片段”指与抗原结合或与完整抗体(即其衍生来源的完整抗体)竞争抗原结合(即特异性结合)的抗体多肽片段。抗原结合片段可以通过本领域熟知的重组或生化方法产生。示范性抗原结合片段包括Fv、Fab、Fab'、(Fab')₂、CDR、互补位和单链Fv抗体(scFv),其中V_H和V_L链结合在一起(直接或通过肽接头)形成连续的多肽。

[0073] 抗体还包括变体、嵌合抗体和人源化抗体。如本文所用,术语“抗体变体”是指在重链和/或轻链中具有单个或多个突变的抗体。在一些实施方式中,突变存在于可变区中。在一些实施方式中,突变存在于恒定区中。“嵌合抗体”指如下抗体,其中重链和轻链各自的氨基酸序列的一部分与源自特定物种或属于特定类别的抗体中的相应序列同源,而链的剩余区段与其他物种或类别的相应序列同源。典型地,在这些嵌合抗体中,轻链和重链的可变区模仿源自一种哺乳动物的抗体可变区,而恒定部分与源自另一种哺乳动物的抗体中的序列同源。这些嵌合形式的一种显著优点是例如能使用来自非人宿主生物的轻易可得的杂交瘤或B细胞便利地从目前已知的序列衍生可变区,而从例如人细胞制备物衍生恒定区。虽然可变区具有易于制备且特异性不受其来源的影响的优点,但当注射抗体时,恒定区为人类,与非人类来源的恒定区相比,不易引发人类受试者的免疫反应。然而,定义不限于此特定示例。“人源化”抗体是指具有基本上来源于非人类物种的免疫球蛋白的抗原结合位点和基于人类免疫球蛋白的结构和/或序列的分子的剩余免疫球蛋白结构的分子。抗原结合位点可包括融合在恒定区上的完整可变结构域或仅移植到可变结构域中的合适框架区的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型或通过一个或多个氨基酸取代修饰,例如修饰为更接近地类似于人免疫球蛋白。人源化抗体的一些形式保留了所有的CDR序列(例如人源化小鼠抗体,其包含来自小鼠抗体的全部六个CDR)。其他形式的人源化抗体具有相对于原始抗体改变的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个或六个),其也被称为一个或多个“衍生自”一个或多个CDR的CDR。

[0074] 如本文所述,抗体氨基酸残基可根据Kabat的通用编号系统编号(Kabat等(1991)《免疫学热门蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第五版.NIH,公共卫生局(Public Health Service),马里兰州贝塞斯达)。

[0075] 如本文抗体和作为靶标的Cx43的表位之间的结合的上下文中所用术语“结合”指分子间的非共价相互作用的过程。优选地,所述结合具有特异性。抗体的特异性可以基于亲和力确定。特异性抗体对其表位的结合亲和力或解离常数K_D小于10⁻⁷M,优选小于10⁻⁸M。

[0076] 术语“抗原”指的是能够被选择性结合剂(例如抗体)结合的分子或分子的一部分,

还能够被用于动物以产生能够结合至该抗原表位的抗体。抗原可以具有一个或多个表位。

[0077] 术语“表位”包括任意能够特异性结合至免疫球蛋白或T细胞受体的决定区(优选多肽决定区)。在某些实施方式中,表位决定簇包括有化学活性的成组表面分子(例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基基团),而在某些实施方式中,表位决定簇可具有特定的三维结构特点和/或特定的荷电特点。在一个实施方式中,表位是被抗体结合的抗原的区域。在一些实施方式中,当抗体在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其目标抗原时,称为与抗原特异性结合。表位作图的方法是本领域熟知的,例如X光共结晶学鉴定、基于阵列的寡肽扫描、定点诱变、高通量诱变作图和氢-氘交换。表位既可以由连续氨基酸形成,也可以由蛋白质三级折叠并列的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包含呈现独特空间构象的至少3个、更通常至少5个或约8-10个氨基酸。

[0078] 术语“对象”或“患者”包括人或其他哺乳动物,其接受预防性或治疗性处理。

[0079] 如本文所用术语“处理”和“治疗”是指治疗性或预防性措施,例如本文所述的那些。“处理”的方法是向患者给予本文提供的Cx43配体,例如患有癌症的患者,以预防、治愈、延迟、降低癌症或复发癌症的一种或多种症状的严重性或改善一种或多种症状,或延长患者的生存期超出没有这种治疗的情况下所预期的情况。“治疗”的方法还采用向患者给予本文提供的Cx43配体(例如抗体)以向患者提供超出没有这种治疗的情况下所预期的癌症治疗。

[0080] 术语“癌症”广义上是指宿主自身细胞的不受控制的异常生长,导致入侵周围组织和宿主异常细胞生长初始部位远端的潜在组织。主要类别包括:上皮组织(例如皮肤、鳞状细胞)的癌症上皮癌;结缔组织(例如,骨、软骨、脂肪、肌肉、血管等)的癌症肉瘤;造血组织(例如骨髓组织)的癌症白血病;免疫细胞的癌症淋巴瘤和骨髓瘤;和中枢神经系统癌症,其包括源自脑和脊髓组织的癌症。术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”在本文中可互换使用。本文中,术语“癌症”指所有类型的癌症、赘生物或恶性肿瘤,包括白血病、上皮癌和肉瘤,新发的或复发的。癌症的特例为:上皮癌、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤和混合类型肿瘤。癌症的非限制性例子是新发或复发性的脑癌、黑色素瘤、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宫癌和成神经管细胞瘤。

[0081] 如本文所用术语“有效量”指的是当给予患者时,足以实现癌症的治疗、预后或诊断的试剂(例如Cx43配体,例如抗Cx43抗体)的量。治疗有效量可以根据患者和所治疗的疾病或病症,对象的体重和年龄,疾病或病症的严重程度以及给药方式等而变化,这些都可由本领域普通技术人员容易地确定。给药剂量范围可以是例如约1ng至约10,000mg,约5ng至约9,500mg,约10ng至约9,000mg,约20ng至约8,500mg,约30ng至约7,500mg,约40ng至约7,000mg,约50ng至约6,500mg,约100ng至约6,000mg,约200ng至约5,500mg,约300ng至约5,000mg,约400ng至约4,500mg,约500ng至约4,000mg,约1 μ g至约3,500mg,约5 μ g至约3,000mg,约10 μ g至约2,600mg,约20 μ g至约2,575mg,约30 μ g至约2,550mg,约40 μ g至约2,500mg,约50 μ g至约2,475mg,约100 μ g至约2,450mg,约200 μ g至约2,425mg,约300 μ g至约2,000,约400 μ g至约1,175mg,约500 μ g至约1,150mg,约0.5mg至约1,125mg,约1mg至约1,100mg,约1.25mg至约1,075mg,约1.5mg至约1,050mg,约2.0mg至约1,025mg,约2.5mg至约1,000mg,约3.0mg至约975mg,约3.5mg至约950mg,约4.0mg至约925mg,约4.5mg至约900mg,约

5mg至约875mg,约10mg至约850mg,约20mg至约825mg,约30mg至约800mg,约40mg至约775mg,约50mg至约750mg,约100mg至约725mg,约200mg至约700mg,约300mg至约675mg,约400mg至约650mg,约500mg,或约525mg至约625mg本文提供的抗体或其抗原结合片段。给药可以是例如每周、每两周、每三周、每四周、每五周或每六周。可调节剂量方案以提供最佳治疗性缓解。有效量还是试剂的任何毒性或有害效果(副作用)最小化和/或被有益效果抵消的量。给药可以是静脉内精确或约6mg/kg或12mg/kg每周静脉内给药,或者以12mg/kg或24mg/kg每两周静脉内给药。其它给药方案如下所述。

[0082] 如本文所用,“制剂”是适用于对有需要的患者进行肠胃外给药(包括但不限于静脉内、肌内或皮下)的药学活性药物的组合物,例如生物活性蛋白(例如抗体),并且仅包括药学上可接受的赋形剂、稀释剂和其他被联邦药物管理局或其他外国国家当局认为安全的添加剂。

[0083] 如本文所用短语“液体制剂”和“水性制剂”可互换使用,是指含有生物药物和一种或多种赋形剂(例如化学添加剂)组合的溶液或液体制剂——溶解在合适的溶剂中。

[0084] “稳定的”制剂是在预定温度(例如,-20℃或2-8℃的冷藏温度)持续一段时间(例如,至少3个月、至少6个月、至少1年或多达2年)观察无显著变化。本文公开的制剂的稳定性可以使用以下标准中的一种或多种来评估:1)水性制剂是无色的,或通过目测分析透明至微乳白色;2)蛋白质含量维持在初始浓度 \pm 5mg/mL以内;3) pH值保持在目标pH值的 \pm 0.2pH单位内;4) SEC单体百分比 \geq 95%;5) CE-SDS测得纯度为 \geq 90%,基于ELISA相对效力在50-150%以内。

[0085] 如本文所用术语“赋形剂”意为指无治疗性活性的物质。赋形剂被包含在制剂中用于多种用途,例如,作为缓冲液、稳定剂、张力剂、表面活性剂、抗氧化剂、冷冻保护剂或稀释剂。

[0086] 合适的赋形剂包括但不限于多元醇(也称为糖醇)如甘露醇或山梨糖醇,糖如蔗糖、乳糖或葡萄糖,盐如NaCl、KCl或磷酸钙,氨基酸如组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或谷氨酸,表面活性剂以及水。赋形剂的纯度应符合药典标准(如USP、EP、JP),并具有足够的纯度,可用于人体皮下、肌肉或静脉内注射。

[0087] 如本文所用,术语“缓冲液”或“缓冲剂”是指药学上可接受的赋形剂,其稳定药物制剂的pH。合适的缓冲液在本领域中是众所周知的并且可以在文献中找到。例如,可以采用柠檬酸盐、乙酸盐、组氨酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、磷酸盐或乳酸盐,和/或其各自的游离酸或碱,以及各种盐和/或酸和碱的混合物。在一个具体的实施方式中,药学上可接受的缓冲液包括但不限于组氨酸缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液。在一个具体实施方式中,缓冲液是乙酸盐缓冲液,例如乙酸钠缓冲液。其他特定的缓冲液是组氨酸缓冲液,即具有组氨酸,通常是L-组氨酸作为缓冲剂的缓冲液。一种特定的缓冲液是L-组氨酸/HCl缓冲液,包含L-组氨酸或L-组氨酸和L-组氨酸盐酸盐的混合物,并用盐酸调节pH。除非另有说明,术语“L-组氨酸”在本文用于描述缓冲剂时是指L-组氨酸/HCl缓冲液。L-组氨酸/HCl缓冲液可以通过将适量的L-组氨酸和L-组氨酸盐酸盐溶解在水中来制备,或者通过将适量的L-组氨酸溶解在水中并通过添加盐酸将pH调节至所需值来制备。上述缓冲液通常以约1mM至约100mM、约10mM至约50mM、约15至30mM或20mM的浓度使用。无论使用何种缓冲液,都可以用本领域已知的酸或碱将pH值调节至约4.0至约7.0、约5.0至

约6.0、约5.4至约5.6或约5.5范围内的值,例如,盐酸、乙酸、磷酸、硫酸和柠檬酸、氢氧化钠和氢氧化钾。

[0088] 如本文所用,术语“表面活性剂”表示药学上可接受的表面活性剂。在一个具体实施方式中,使用非离子表面活性剂。药学上可接受的表面活性剂的实例包括但不限于聚氧乙烯-山梨糖醇酐脂肪酸酯(Tween)、聚氧乙烯烷基醚(Brij)、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(Poloxamer、Pluronic)和十二烷基硫酸钠(SDS)。在一个具体的实施方式中,聚氧乙烯-山梨糖醇酐脂肪酸酯是聚山梨醇酯20(聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯,以商标Tween20TM销售)和聚山梨醇酯80(聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯,以商标Tween80TM销售)。在一个具体实施方式中,聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物是以名称**Pluronic**®F68或Poloxamer188TM出售的那些。在一个具体实施方式中,聚氧乙烯烷基醚是以商标BrijTM出售的那些。在一个具体实施方式中,烷基苯基聚氧乙烯醚以商品名Triton X出售,例如对叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(以商品名Triton X-100TM出售)。当使用聚山梨醇酯20(Tween20TM)和聚山梨醇酯80(Tween80TM)时,它们通常以约0.001至约1%、约0.01至约0.1%或约0.02%至约0.05%的浓度范围使用。在本公开的制剂中,表面活性剂的浓度被描述为百分比,以重量/体积(w/v)表示。

[0089] 本文所用的术语“稳定剂”是指一种药学上可接受的赋形剂,它保护活性药物成分和/或制剂在制造、储存和应用过程中不发生化学和/或物理降解。稳定剂包括但不限于糖类、氨基酸、多元醇,如甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、葡聚糖、甘油、阿拉伯糖醇、丙二醇、聚乙二醇、环糊精,如羟丙基-β-环糊精、磺酰丁基-β-环糊精、β-环糊精、聚乙二醇,例如PEG3000、PEG 3350、PEG 4000、PEG 6000,白蛋白,如人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA),盐类,例如氯化钠、氯化镁、氯化钙,螯合剂,例如EDTA,如下文所定义。如上所述,稳定剂可以以约1至约500mM的量、约10至约300mM的量或约120mM至约300mM的量存在于制剂中。制剂中可以存在选自相同或不同组的多于一种的稳定剂。

[0090] 本文所用术语“糖”包括单糖和寡糖。单糖是一种不能被酸水解的单体碳水化合物,包括单糖及其衍生物,如氨基糖。糖类通常呈D构象。单糖的例子包括葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖、山梨糖、核糖、脱氧核糖、神经氨酸。寡糖是由多于一个的单体糖单元组成的碳水化合物,其通过一个或多个糖苷键连接,可以是支链或直链。寡糖中的单体糖单元可以是相同的或不同的。根据单体糖单元的数量,寡糖是二糖、三糖、四糖、五糖等等。与多糖不同,单糖和寡糖是水溶性的。寡糖的例子包括蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖和棉子糖。在特定的实施方式中,糖是蔗糖和海藻糖(即α,α-D-海藻糖),例如,蔗糖。海藻糖可以海藻糖二水合物获得。糖类可以以约100至约500mM的量、约200至约300mM的量或约240mM的量存在于制剂中。

[0091] 稳定剂中的一个亚组是冻干保护剂。术语“冻干保护剂”指的是药学上可接受的赋形剂,它可以保护不稳定的活性成分(如蛋白质)在冻干过程、随后的储存和重建过程中不受去稳定条件影响。冻干保护剂包括但不限于由糖类、多元醇(如糖醇)和氨基酸组成的组。在特定的实施方式中,冻干保护剂可选自糖类,如蔗糖、海藻糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、神经氨酸、氨基糖,例如葡糖胺、半乳糖胺、N-甲基葡糖胺(“葡甲胺(Meglumine)”),多元醇如甘露糖醇和山梨糖醇,以及氨基酸如精氨酸和甘氨酸或其混合物。冻干保护剂的使用量一般为约10至500mM的量、约10至约300mM的量或约100至约

300mM的量。

[0092] 稳定剂中的另一个亚组是抗氧化剂。术语“抗氧化剂”指的是药学上可接受的赋形剂,其防止活性药物成分的氧化。抗氧化剂包括但不限于抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、甲硫氨酸、柠檬酸、EDTA。抗氧化剂的使用量可以是约0.01至100mM、约5至约50mM的量或约5至约25mM的量。

[0093] 根据本发明的制剂还可包括一种或多种张力剂。术语“张力剂”是指用于调节制剂张力的药学上可接受的赋形剂。制剂可以是低渗、等渗或高渗的。一般来说,等渗性与溶液的渗透压有关,通常是相对于人血清的(约250-350mOsmol/kg)。根据本发明的制剂可以是低渗、等渗或高渗的。在特定实施方式中,制剂是等渗的。等渗制剂是液体或从固体形式(例如从冻干的形式)重建的液体,是指具有与一些与其进行比较的其他溶液(如生理盐溶液和血清)相同的张力。合适的张力剂包括但不限于氯化钠、氯化钾、甘油和来自氨基酸或糖类的任何成分,特别是葡萄糖。张力剂通常以约5mM至约500mM的量使用。

[0094] 在稳定剂和张力剂中,有一组化合物可以发挥两种作用,即它们可以同时作为稳定剂和张力剂。其例子可以取自下组:糖类、氨基酸、多元醇、环糊精、聚乙二醇和盐类。可以同时作为稳定剂和张力剂的糖的一个例子是海藻糖。

[0095] 蛋白质的“等电点”或“pI”是指蛋白质总体净电荷等于零的pH值,即蛋白质具有相同数量的正负电荷的pH值。任何给定的蛋白质的pI的确定都可以根据已经建立的技术来完成,例如,通过等电聚焦。等电聚焦是一种通过不同分子的等电点(pI)差异来分离它们的技术。它是一种区域电泳,通常在凝胶中对蛋白质进行电泳,利用感兴趣的分子上的整体电荷是其周围环境的pH值的一个函数这一事实。

[0096] 下面进一步详细描述本公开的各个方面。在整个说明书中提供了其他定义。

[0097] 药物制剂

[0098] 在一些实施方式中,本发明提供包含如本文所述的抗Cx43抗体或其抗原结合片段的药物组合物。抗Cx43抗体或其抗原结合片段可以具有第一、第二和第三重链互补决定区(CDR)序列,其分别具有SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列;和第一、第二和第三轻链CDR序列,分别具有SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列。

[0099] 在一些实施方式中,抗Cx43抗体或其抗原结合片段可以包括重链可变结构域和轻链可变结构域,其中所述重链可变结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:7,和所述轻链可变结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0100] 在某些实施方式中,抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0101] 在某些实施方式中,抗Cx43抗体或其抗原结合片段结合至位于FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:19)的氨基酸序列内的表位。

[0102] 在一些实施方式中,抗-Cx43抗体或其抗原结合片段是以约5至约50mg/mL的浓度存在,或10至40mg/mL,或约15至30mg/mL。

[0103] 在多种实施方式中,抗Cx43抗体或其抗原结合片段可以是以药学上可接受的量和药学上可接受的组成配制。如本文所用,“药学上可接受的”应指可用于制备基本安全无毒的药物组合物,所述药物组合物既非生物学不利也无其他不利情况,并包括可用于兽医用途以及人类药物用途。“药学上可接受的液体运载体”的实例包括水和有机溶剂。优选的药

学上可接受的水性液体包括PBS, 盐水和右旋糖溶液等。

[0104] 如本文所用, 术语“药学上可接受的盐”意为任何本文所述的化合物的药学上可接受的盐。例如, 本文所述的任何化合物的药学上可接受的盐包括那些在合理的医学判断范围内, 适于与人和动物的组织接触且没有过度毒性、刺激、过敏反应等, 并且与合理的效益/风险比相称的盐。药学上可接受的盐是本领域公知的。例如, 药学上可接受的盐描述于: Berge等, *J. Pharmaceutical Sciences* 66:1-19, 1977和《药用盐手册: 性质、选择和使用》(Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use), (编P. H. Stahl和C. G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008中。盐可以在本文所述化合物的最终分离和纯化期间原位制备, 或者通过游离碱基团与合适的有机酸反应而单独地制备。

[0105] 有各种文献参考, 有助于选择药学上可接受的运载体或赋形剂。参见, 例如, 《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) 和《美国药典: 国家处方集》, 麦克出版公司 (Mack Publishing Company), Easton, Pa. (1984); Hardman等人 (2001) Goodman和Gilman的《治疗的药理学基础》(The Pharmacological Basis of Therapeutics), 纽约州纽约的MGH公司 (McGraw-Hill, New York, N.Y.); Gennaro (2000) 《雷鸣顿: 药物科学和实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy); Lippincott, Williams和Wilkins, 纽约州纽约; Avis等人 (编) (1993) 《药物剂型: 肠胃外药物》(Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications); 纽约州MD公司 (Marcel Dekker, NY); Lieberman等人 (编) (1990) 《药物剂型: 片剂》(Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets), 纽约州MD (Marcel Dekker) 公司; Lieberman等人 (编) (1990) 《药物剂型: 分散体系》(Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems), 纽约州MD公司; Weiner, Wang, W., *Int. J. Pharm.* 185: 129-188 (1999) 和Wang, W., *Int. J. Pharm.* 203:1-60 (2000), 和Kotkoskie (2000) 《赋形剂毒性和安全性》(Excipient Toxicity and Safety), 纽约州纽约MD公司。

[0106] 在一些实施方式中, 抗体制剂可以包含缓冲液 (例如组氨酸、乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂 (例如聚山梨醇酯) 和/或稳定剂 (例如蔗糖) 等。

[0107] 缓冲液用于将pH控制在达到最佳治疗有效性的范围内, 尤其是在稳定性取决于pH的情况下。缓冲液可以以约50mM至约250mM范围内的浓度存在。用于本发明的合适的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐。例如柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。此外, 缓冲液可以包括组氨酸和三甲胺盐 (例如Tris)。

[0108] 在一些实施方式中, 缓冲液可以选自乙酸/乙酸钠、组氨酸/天冬氨酸、柠檬酸/柠檬酸钠、磷酸二钠 (dibasic sodium phosphate)/磷酸二氢钠和组氨酸/组氨酸盐酸盐。如本文所用“/”, 当指缓冲液组合“A/B”时, 意为组分A和组分B (例如, 组分A的盐) 都存在。在某些实施方式中, 缓冲液是组氨酸/天冬氨酸或组氨酸/组氨酸盐酸盐。在某些实施方式中, 缓冲液是组氨酸/组氨酸盐酸盐。

[0109] 存在非离子表面活性剂或去污剂 (也称为“湿润剂”), 以帮助溶解治疗剂并保护治疗蛋白免于搅动引起的聚集, 这也使制剂暴露于剪切表面应力而不会引起活性治疗性蛋白质或抗体的变性。非离子表面活性剂以约0.05mg/ml至约1.0mg/ml或约0.07mg/ml至约0.2mg/ml的范围存在。

[0110] 合适的非离子表面活性剂包括聚山梨酸酯 (20、40、60、65、80等)、泊洛沙姆 (184、188等)、PLURONIC®多元醇、TRITON®、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单醚 (TWEEN®-20、

TWEEN®-80等)、聚桂醇400、聚乙二醇硬脂酸酯40 (polyoxyl 40stearate)、聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60、单硬脂酸甘油酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。可以使用的阴离子去污剂包括月桂基硫酸钠、琥珀酸二辛酯磺酸钠和磺酸二辛酯钠。阳离子去污剂包括苯扎氯铵和苜索氯铵。在一些实施方式中,表面活性剂是聚山梨醇酯80 (PS80)。

[0111] 在某些实施方式中,稳定剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)、氯化钠、山梨糖醇、甘氨酸和蔗糖。在某些实施方式中,稳定剂是蔗糖。

[0112] 其他赋形剂包括可用作以下一种或多种的试剂:(1)填充剂、(2)溶解度增强剂、(3)稳定剂和(4)防止变性或粘附在容器壁上的试剂。这样的赋形剂包括:多元糖醇(上面列举);氨基酸,例如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸,2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等;有机糖或糖醇,例如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌醇糖(myoinisitose)、肌-肌醇、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环糖醇(例如,肌醇)、聚乙二醇;含硫的还原剂,例如脲、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量蛋白质,例如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其他免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;单糖(例如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖);二糖(例如,乳糖、麦芽糖、蔗糖);三糖(例如,棉子糖);以及多糖(例如葡聚糖或右旋糖酐)。

[0113] 在一些实施方式中,抗体制剂可包含药学上可接受的运载体,包括例如,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂,血清蛋白质如人血清白蛋白,缓冲物质如磷酸盐、蔗糖、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质,如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-段聚合物和聚乙二醇。在一些实施方式中,抗体制剂还包括表面活性剂。在一些实施方式中,表面活性剂选自下组:聚山梨醇酯、十二烷基硫酸钠和非离子表面活性剂。

[0114] 根据本发明的制剂可以是液体形式、冻干形式或由冻干形式重建的液体形式。在某些实施方式中,制剂是液体形式。与根据本发明的制剂有关的本文中所用术语“液体”表示在大气压力下温度至少为约2至约8°C时是液体的制剂。本文中根据本公开的制剂有关的术语“冻干的”是指通过本领域本身已知的冻干方法制造的制剂。通过冷冻然后在真空下升华冰去除溶剂(如水),在升高的温度下解吸残留的水。冻干物通常具有约0.1至5% (w/w)的残留水分,并以粉末或物理稳定的饼状存在。冻干物特征在于在加入重建介质后能快速溶解。

[0115] 本文中根据本公开的制剂有关的术语“重建形式”是指被冻干且通过添加重建介质重新溶解的制剂。合适的重组介质包括但不限于注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如,0.9% (w/v) NaCl)、葡萄糖溶液(例如,5%葡萄糖)、包含表面活性剂的溶液(例如,0.02%聚山梨醇酯80)、pH-缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)。

[0116] 根据本发明的制剂在生理上具有良好的耐受性,可以很容易地制备,可以精确地分配,并且在储存期间,在反复的冷冻和解冻循环以及机械应力期间,对分解产物和聚集物具有稳定性。它在储存温度(如-20°C或2-8°C)下的稳定超过1年。

[0117] 本公开的抗体制剂可以是水性溶液。在一些实施方式中,抗体制剂没有经过冷冻温度,和/或没有被冷冻,即,它们一直保持在液体状态。在一些实施方式中,抗体制剂中的

抗体还未经过冻干。

[0118] 在一些实施方式中,本文公开的抗体制剂相对于其他制剂具有改进的稳定性。如本文所使用的,术语“稳定性”通常与保持生物活性剂,如蛋白质、肽或其他生物活性大分子的完整性或最小化其降解、变性、聚集或去折叠有关。如本文所用,“改进的稳定性”通常是指在已知会导致降解、变性、聚集或去折叠的条件下,蛋白质(例如抗体,例如抗Cx43 Ab)、肽或另一种感兴趣的生物活性大分子与对照的蛋白质、肽或另一种生物活性大分子相比保持更大的稳定性。

[0119] 在一些实施方式中,稳定性是指抗体制剂具有低至不可检测的颗粒形成水平。此处所用的“低至不可检测的颗粒形成水平”是指通过HIAC分析或视觉分析确定的含有低于30个颗粒/毫升、低于20个颗粒/毫升、低于20个颗粒/毫升、低于15个颗粒/毫升、低于10个颗粒/毫升、低于5个颗粒/毫升、低于2个颗粒/毫升或低于1个颗粒/毫升的样品。在一些实施方式中,通过HIAC分析或视觉分析,在抗体制剂中没有检测到颗粒。

[0120] 在一些实施方式中,稳定性指的是抗体的片段化减少。本文所用术语“低至不可检测的片段化水平”是指,含有等于或超过80%、85%、90%、95%、98%或99%的总蛋白的样品,例如,在HPSEC测定的单一峰中,或在通过还原毛细管凝胶电泳(rCGE)测定的两个峰中(例如重链和轻链)(或有多少个亚基就有多少个峰),这代表非降解抗体或其非降解片段,且不包含其他每个峰中具有超过5%、超过4%、超过3%、超过2%、超过1%或超过0.5%的总蛋白的单个峰。本文所用的术语“还原毛细管凝胶电泳”是指在足以减少抗体中二硫键的还原条件下进行的毛细管凝胶电泳。

[0121] 本领域技术人员会理解蛋白质的稳定性除了取决于制剂的组成外,还取决于其他特征。例如,稳定性会受到温度、压力、湿度、pH值和外部辐射形式的影响。因此,除非另有规定,本文提到的稳定性被认为是在-20℃、一个大气压、50%的相对湿度、pH值为5.5,以及正常的背景辐射水平下测量的。抗体制剂中的抗体的稳定性可以通过各种方法确定。在一些实施方式中,抗体稳定性通过尺寸排阻色谱(SEC)来确定。SEC基于其流体动力学大小、扩散系数和表面特性的组合来分离分析物(例如大分子,例如蛋白质和抗体)。因此,例如,SEC可以将天然三维构象的抗体与多种变性状态的抗体和/或已经降解的抗体分离。在SEC中,固定相通常由惰性颗粒构成,装入玻璃或钢柱中的致密三维基质。流动相可以是纯水、水性缓冲液、有机溶剂、这些的混合物,或其他溶剂。固定相颗粒有小孔和/或通道,只允许低于一定尺寸的种类进入。因此,大颗粒被排除在这些孔和通道之外,但较小的颗粒被从流动的流动相中移除。颗粒固定在固定相孔隙中的时间部分取决于它们能穿透多远的孔隙。将它们从流动相中移出会导致它们需要更长的时间从色谱柱中洗脱出来,并导致基于颗粒大小的差异而在它们之间进行分离。

[0122] 在一些实施方式中,SEC与鉴定技术相结合来鉴定或表征蛋白质或其片段。蛋白质鉴定和表征可以通过各种技术完成,包括但不限于色谱技术,例如高效液相色谱法(HPLC)、免疫分析、电泳、紫外/可见/红外光谱、拉曼光谱、表面增强拉曼光谱、质谱、气相色谱、静态光散射(SLS)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、圆二色性(CD)、尿素诱导蛋白去折叠技术、固有色氨酸荧光、差示扫描量热法和/或ANS蛋白结合。

[0123] 在一些实施方式中,蛋白质鉴定是通过高压液相色谱法实现的。本领域的技术人员已知有各种仪器和装置可以进行HPLC。一般来说,HPLC涉及将含有感兴趣的蛋白质的液

体溶剂装入分离柱,在其中发生分离。HPLC分离柱中充满了固体颗粒(如二氧化硅、聚合物或吸附剂),样品混合物在与柱颗粒相互作用时被分离成化合物。HPLC分离受液体溶剂的条件(例如压力、温度)、样品混合物与液体溶剂之间的化学相互作用(如疏水性、质子化等)以及样品混合物与分离柱内填充的固体颗粒之间的化学相互作用(如配体亲和力、离子交换等)的影响。

[0124] 在一些实施方式中,SEC和蛋白质鉴定在同一设备中或同时进行。例如,可以组合SEC和HPLC,通常被称为SE-HPLC。

[0125] 本文所述抗体的稳定性可以通过使用无毒的“水溶性多价金属盐”来增强。例子包括Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Sn²⁺、Sn⁴⁺、Al²⁺和Al³⁺。能与上述多价金属阳离子形成水溶性盐的阴离子例子包括那些由无机酸和/或有机酸形成的阴离子。这种水溶性盐在水中(20℃时)的溶解度至少约为20mg/ml,或者至少约为100mg/ml,或者至少约为200mg/ml。

[0126] 可用于形成“水溶性多价金属盐”的合适无机酸包括盐酸、乙酸、硫酸、硝酸、硫氰酸和磷酸。可使用的合适有机酸包括脂肪族羧酸和芳香族酸。本定义中的脂肪族酸可定义为饱和或不饱和的C₂-9羧酸(例如,脂肪族一元(单)、二(元)和三(元)羧酸)。例如,此定义中的示例性单羧酸包括饱和的C₂-9单羧酸乙酸、丙酸(propionic)、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸和癸酸(caprylic),以及不饱和的C₂-9单羧酸丙烯酸、丙酸甲基丙烯酸、巴豆酸和异巴豆酸。示例性的二羧酸包括饱和的C₂-9二羧酸丙二酸、琥珀酸、戊二酸、己二酸和庚二酸,而不饱和的C₂-9二羧酸包括马来酸、富马酸、柠康酸(citraconic)和甲基延胡索酸(mesaconic acid)。示例性的三羧酸包括饱和的C₂-9三羧酸丙三酸和1,2,3-丁烷三羧酸(1,2,3-butanetricarboxylic acid)。此外,本定义中的羧酸还可以包含一个或两个羟基,形成羟基羧酸。示范性的羟基羧酸包括羟基乙酸、乳酸、甘油酸、丙醇二酸、苹果酸、酒石酸和柠檬酸。此定义中的芳香族酸包括苯甲酸和水杨酸。

[0127] 常用的水溶性多价金属盐可用于帮助稳定本发明的包封的多肽,包括,例如:(1)卤化物(如氯化锌、氯化钙)、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐和硫氰酸盐的无机酸金属盐;(2)脂肪族羧酸金属盐(例如,乙酸钙、乙酸锌、丙酸钙、乙醇酸锌、乳酸钙、乳酸锌和酒石酸锌);以及(3)苯甲酸盐(例如,苯甲酸锌)和水杨酸盐的芳香族羧酸金属盐。

[0128] 在一些实施方式中,水溶液制剂包括约2mg/ml至约100mg/ml的抗体,其中该抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包括Kabat定义的SEQ ID NO:1-3的CDR1、CDR2和CDR3序列,其中轻链可变区包括Kabat定义的SEQ ID NO:4-6的CDR1、CDR2和CDR3序列,其中所述制剂在约40℃下储存至少1个月后是稳定的。在一些实施方式中,该制剂在约25℃下储存至少3个月后是稳定的。在一些实施方式中,该制剂在约5℃下储存至少6个月后是稳定的。在一些实施方式中,该制剂在约5℃下储存至少12个月后是稳定的。在一些实施方式中,该制剂在约5℃下储存至少18个月后是稳定的。在一些实施方式中,该制剂在约5℃下储存至少24个月或36个月后是稳定的。

[0129] 术语“稳定”可以是相对的而不是绝对的。因此,在一些实施方式中,如果当抗体在-20℃储存6个月时,经SEC HPLC测定,少于20%、少于15%、少于10%、少于5%或少于2%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,则该抗体是稳定的。在一些实施方式中,如果当抗体在-20℃储存12个月时,经SEC HPLC测定,少于20%、少于15%、少于10%、少于5%或少于

2%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,则该抗体是稳定的。在一些实施方式中,如果当抗体在-20℃储存18个月时,经SEC HPLC测定,少于20%、少于15%、少于10%、少于5%或少于2%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,那么抗体制剂中的抗体是稳定的。在一些实施方式中,如果当抗体在-20℃储存24个月时,经SEC HPLC测定,少于20%、少于15%、少于10%、少于5%或少于2%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,那么抗体制剂中的抗体是稳定的。

[0130] 在一些实施方式中,如果当抗体在23℃至27℃储存3个月时,经SEC HPLC测定,少于20%、少于15%、少于10%、少于5%或少于2%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,则该抗体是稳定的。在一些实施方式中,如果当抗体在23℃至27℃储存6个月时,经SEC HPLC测定,少于20%、少于15%、少于10%、少于5%或少于2%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,则该抗体是稳定的。在一些实施方式中,如果当抗体在23℃至27℃储存12个月时,经SEC HPLC测定,少于20%、少于15%、少于10%、少于5%或少于2%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,则该抗体是稳定的。在一些实施方式中,如果当抗体在23℃至27℃储存24个月时,经SEC HPLC测定,少于20%、少于15%、少于10%、少于5%或少于2%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,则该抗体是稳定的。

[0131] 在一些实施方式中,如果当抗体在40℃储存时,经SEC HPLC测定,每个月少于6%、少于4%、少于3%、少于2%或少于1%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,则该抗体是稳定的。在一些实施方式中,如果当抗体在5℃储存时,经SEC HPLC测定,每个月少于6%、少于4%、少于3%、少于2%或少于1%的抗体被降解、变性、聚集或去折叠,则该抗体是稳定的。

[0132] 在一些实施方式中,如果在8周、4个月、6个月、9个月、12个月或24个月的时间内,与参考抗体相比,通过本领域已知的抗体结合试验,例如ELISA等测量的该制剂的抗体(包括其抗体片段)的结合活性表现得极少或没有损失,则可以认为本公开的抗体制剂是稳定的。在一些实施方式中,与未经储存的参考抗体相比,在约40℃下储存至少1个月的抗体对Cx43的结合能力保持至少60%、至少80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%,至少约98%或至少约99%。在一些实施方式中,与未经储存的参考抗体相比,在约5℃下储存至少6个月的抗体对Cx43的结合能力保持至少80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%,至少约98%或至少约99%。在一些实施方式中,与未经储存的参考抗体相比,在约40℃下储存至少1个月的抗体对Cx43的结合能力保持至少95%。在一些实施方式中,与未经储存的参考抗体相比,在约5℃下储存至少6个月的抗体对Cx43的结合能力保持至少95%。

[0133] 该抗体制剂可以提供低至无法检测的抗体聚集水平。本文所用的短语“低至不可检测的聚集水平”是指通过高效尺寸排阻色谱法(HPSEC)或静态光散射(SLS)技术测量的按蛋白质重量计算,样品包含不超过约5%,不超过约4%,不超过约3%,不超过约2%,不超过约1%,不超过约0.5%的聚集。在一些实施方式中,通过HPSEC测定的确定,在约40℃下储存至少4周后,少于2%的抗体形成聚集。在一些实施方式中,通过HPSEC测定,在约5℃储存至少3个月、至少6个月、至少9个月、至少12个月、至少15个月、至少18个月、至少24个月或至少36个月时,少于2%的抗体形成聚集。

[0134] 已经发现,本文提供的抗体制剂可大大减少颗粒的形成,这一点可通过目视检查、微流成像(MFI)或尺寸排除色谱(SEC)来确定。在一些实施方式中,通过目视检查确定,在约40℃下储存至少1个月,该制剂基本上不含颗粒。在一些实施方式中,通过目视检查确定,在约5℃储存至少6个月、至少9个月、至少12个月、至少15个月、至少18个月、至少24个月或

至少36个月后,该制剂基本上不含颗粒。

[0135] 该组合物还可包含佐剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可通过灭菌步骤和加入各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等确保防止微生物的出现。防腐剂通常以约0.001至约2% (w/v) 的量使用。防腐剂包括但不限于乙醇、苯甲醇、酚、间甲酚、对氯间甲酚、甲基或丙基对羟苯甲酸酯类(parabens)、苯扎氯铵。

[0136] 本文所述的抗体制剂可以有多种粘度。测量抗体制剂的粘度的方法是本领域的人所熟知的,可以包括,例如,流变仪(例如,安东帕(Anton Paar)MCR301流变仪,带有50mm、40mm或20mm的平板配件)。在本发明的一些实施方式中,粘度是在1000/秒剪切率的高剪切极限下报告的。在一些实施方式中,抗体制剂的粘度低于20厘泊(cP),低于18cP、低于15cP、低于13cP或低于11cP。在一些实施方式中,抗体制剂的粘度低于13cP。本领域技术人员将理解粘度取决于温度,因此,除非另有说明,本文提供的粘度是在25℃下测得的。

[0137] 抗体制剂可以具有不同的渗透压浓度。测量抗体制剂的渗透压的方法是本领域的人所熟知的,可以包括,例如,渗透压计(例如,先进仪器公司(Advanced Instrument Inc.)2020凝固点抑制渗透压仪(freezing point depression osmometer))。在一些实施方式中,该制剂的渗透压在200至600mosm/kg之间,260至500mosm/kg之间,或300至450mosm/kg之间。

[0138] 本发明的抗体制剂可以具有各种pH水平。在一些实施方式中,抗体制剂的pH在4至7之间,4.5至6.5之间,5至6之间,或5.4至5.6之间。在一些实施方式中,抗体制剂的pH为5.5。在一些实施方式中,抗体制剂的pH为6.0。在一些实施方式中,抗体制剂的pH \geq 7.0。在实现所需的pH水平时可以利用各种手段,包括但不限于加入适当的缓冲液。

[0139] 在一些实施方式中,抗体制剂可以包括:约10-50mg/mL、或约25mg/mL的抗-Cx43抗体或其抗原结合片段;约10-40mM、或约20mM的组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液;约0.005%-0.05%、或约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约1%-20%w/v、或约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0140] 在一些实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有选自SEQ ID NO:9-17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0141] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0142] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0143] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗

糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0144] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0145] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0146] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0147] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0148] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0149] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0150] 在一个实施方式中,抗体制剂可以包括:约25mg/mL抗-Cx43抗体或其抗原结合片段,包括重链,其具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列,和轻链,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列;约20mM的组氨酸/天冬氨酸缓冲液;约0.02%w/v的聚山梨醇酯80;和约8%w/v的蔗糖;其中该制剂pH为约5.4至约5.6,或约5.5。

[0151] 在一些实施方式中,本发明提供包含本文所述任何抗体制剂、本文所述容器、本文所述单位剂型或本文所述预充式注射器的试剂盒。

[0152] 治疗用途

[0153] 在一些实施方式中,本公开的抗体制剂可用于制药目的。用于制药应用的抗体通常必须具有较高的纯度,特别是在来自细胞培养的污染物方面,包括细胞蛋白污染物、细胞DNA污染物、病毒和其他可传染的制剂。参见“WHO对使用动物细胞作为体外基材生产生物制品的要求:对生物物质的要求第50号”第878号。附件1,1998年。为了回应对污染物的关注,世界卫生组织(WHO)对各种污染物的水平进行了限制。例如,WHO建议蛋白质产品的DNA限制为每剂小于10ng。同样地,美国食品和药物管理局(FDA)设定的DNA限制为小于或等于0.5pg/mg蛋白质。因此,在一些实施方式中,本发明的内容涉及符合或超过一个或多个政府

组织,如美国食品和药物管理局和/或世界卫生组织定义的污染物限制的抗体制剂。

[0154] 本公开的抗体制剂可以通过多种方式给予对象。在一些实施方式中,抗体制剂适合于肠外给药,例如,通过吸入(例如,粉末或气溶胶喷雾)、经粘膜、静脉内、皮下注射或肌内给予。在一些实施方式中,制剂是可注射制剂。在一些实施方式中,本公开涉及包含本文所述的任何抗体制剂的密封容器。

[0155] 在一些方面,本发明涉及多种药物剂型。多种剂型可应用于本文提供的制剂。参见,例如,《药物剂型:肠胃外药物》(Pharmaceutical Dosage Form:Parenteral Medications),卷1,第二版。在一个实施方式中,本发明的药物单位剂量包括装在合适容器中的抗体制剂,例如小瓶或注射器。在一个实施方式中,本发明的药物单位剂量包括静脉内、皮下或肌内递送的抗体制剂。在一个实施方式中,本发明的药物单位剂量包括气溶胶递送的抗体制剂。在一个实施方式中,本发明的药物单位剂量包括皮下递送的抗体制剂。在一个实施方式中,本发明的药物单位剂量包括气溶胶递送的抗体制剂。在一个实施方式中,本发明的药物单位剂量包括鼻内给予的抗体制剂。

[0156] 本发明的组合物可以通过本领域中已知的多种方法进行给予。本领域技术人员会明白,给药途径和/或方式根据所需结果而有所不同。

[0157] 为了通过某些给药途径给予本公开的组合物,可能需要在稀释剂中稀释该组合物。药学上可接受的稀释剂包括生理盐水、葡萄糖、林格和水性缓冲溶液。

[0158] 在一个特定的实施方式中,根据本公开的制剂通过静脉内(i.v.)、皮下(s.c.)或任何其他肠胃外给予方式给予,如制药领域中已知的那些。

[0159] 本文所用术语“胃肠道外给药”和“经胃肠道外给予”表示除肠道和局部给药外的给药形式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下(subcapsular)、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注给药。

[0160] 该组合物必须是无菌的,并且是流动的,使得该组合物可以通过注射器或输注系统递送。除了水之外,运载体可以是等渗缓冲盐水溶液、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。

[0161] 根据本公开的制剂可以通过本领域已知的方法制备,例如,超滤-渗滤、透析、添加和混合、冻干、重建及其组合。根据本公开的制剂的制备实例可在下文中找到。

[0162] 本文所述的药物组合物可用于治疗癌症、癌症转移、骨肉瘤、骨质疏松症或骨质减少。

[0163] 当癌症从身体的原发部位(如乳腺或前列腺)扩散到身体的其他部位(如肝脏或骨骼)并建立起继发性肿瘤时,就会发生癌症转移。骨骼是癌症转移的最常见部位之一。转移到骨骼的癌症包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、肺癌和皮肤癌(如黑色素瘤)。高达75%的晚期乳腺癌和前列腺癌患者被鉴定为骨转移。骨转移与许多重大的临床和生活质量后果有关,例如,但不限于顽固性疼痛、病理性骨折、脊髓和神经压迫、骨髓浸润和运动能力受损。在许多情况下,癌症的全身性存在也会使癌症无法治愈。

[0164] 骨肉瘤是最常见的原发性骨恶性肿瘤,占有恶性儿童骨肿瘤的60%。在多药化疗之前,截肢提供的长期生存率只有约20%。自20世纪70年代以来,化疗与保肢手术(limb-sparing surgery)的组合一直是骨肉瘤的主要治疗方法。目前,据报道,骨肉瘤患者的5年

生存率为50%至80%。然而,这一生存率在过去10年中并没有改善,足有40%的骨肉瘤患者死于疾病。

[0165] 骨质疏松症是一种全身性骨骼疾病,其特点是骨量低和骨组织的微观结构劣化,随之而来的是骨的脆弱性和对骨折的易感性增加。尽管髌部、脊柱和腕是患有骨质疏松症或有骨质疏松症风险的对象中常见的骨折或断裂的骨骼,任何骨骼都可能受到骨质疏松症的影响。

[0166] 绝经后的白种人妇女的骨质疏松症被定义为骨矿物质密度(BMD)的值比年轻时的平均值低 $>2.5SD$,即T-评分为 $2.5SD$ 。严重的骨质疏松症(已确定的骨质疏松症)使用相同的阈值,但之前有一次或多次脆性骨折。用于诊断目的的优选部位是在髌部、或者是全髌部或股骨颈进行BMD测量。对于男性来说,使用与女性相同的阈值是合适的,因为对于任何给定的BMD,年龄调整后的骨折风险是大致相同的。

[0167] 骨质减少(osteopenia)是一种骨质疏松症的前期症状,特征在于骨量轻度变薄,不像骨质疏松症那样严重。当骨形成不足以补偿正常的骨损失时,就会导致骨质减少。骨质减少一般被认为是趋向骨质疏松症的第一步。无论是否存在骨质疏松症,骨钙化减少(diminished bone calcification)也可称为骨质减少。

实施例

[0168] 提出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供有关如何制造和使用所述组合物和方法的完整公开和说明,而不是限制本发明人所认为的发明的范围。

[0169] 实施例1:材料和方法

[0170] 缩写

[0171]

缩写	全称
卡尺_NR	非还原 CE-SDS 卡尺
卡尺_R	还原 CE-SDS 卡尺
cIEF	毛细管等电聚焦
DS	药物物质
DP	药品
FT	冷冻/解冻
HIAC	颗粒物(Particle matter)
HMW	高分子量
LMW	低分子量
MFI	微流成像/微流体成像
mM	毫摩尔/升
MW	分子量
NA	不适用
ND	未检测到
Ph.Eur.	欧洲药典

[0172]	pI	等电点
	PS80	聚山梨醇酯 80
	rpm	每分钟轮/每分钟旋转
	RT	室温
	SDS-Caliper	卡尺-十二烷基硫酸钠
	SDS-CE-R	还原毛细管电泳-十二烷基硫酸钠
	SDS-CE-NR	非还原毛细管电泳-十二烷基硫酸钠
	SEC-HPLC	尺寸排阻高效液相色谱
	USP	美国药典
	w/v	重量/体积
	A	搅拌
	C	循环
	D	天
	M	月
	T0	时间 0
	W	周

[0173] 装置

说明	供应商	型号
Agilent HPLC	安捷伦科技公司新加坡(销售部)(Agilent Technologies Singapore (Sales)Pt)	1260 系列(1260/1290)
离心机	艾本德(Eppendorf)	离心机 5804R
Clarity 检测器	天大天发(Tianda Tianfa)	YB-2
药物储存盒	海尔(Haier)	HYC-940
电子天平	梅特勒-托利多(Mettler Toledo)	MS6002S/0/MS1003S/01/X S205

	MFI	普诺森 (ProteinSimple)	5200
	调制式差示扫描量热法	TA 仪器-水有限公司 (TA Instruments-Waters LLC)	DSC Q2000
	渗透压计	先进仪器公司 (Advanced Instruments. INC)	Advanced 2020
	pH 计	梅特勒-托利多 (Mettler Toledo)	S40
[0175]	冰箱	海尔(Haier)	HYC-940/ DW-40L508
	冰箱	艾本德(Eppendorf)	U725
	安全罩	上海尚精(Shanghai Shangjing)	BSC-II-A2
	安全罩	Sujing Sutai	BSC-II-A2
	恒温振荡器	上海天承(Shanghai Tiancheng)	TS-200B
	稳定箱	MMM	Climacell 707
	超低温冰箱	艾本德(Eppendorf)	U725
	UV 分光光度计	赛默飞世尔科技公司 (Thermo Scientific)	NanoDrop 2000

[0176] 试剂

试剂	级别	供应商	目录号	批次号
[0177] L-组氨酸	多药典的	贝克 (J.T.Baker)	2080-06	0000090 914
L-组氨酸-单盐酸	多药典的	贝克	2081-06	0000179

[0178]

盐		(J.T.Baker)		922
天冬氨酸	ph Eur/USP	艾普力 (AppliChem)	A1701,1000	6T012474
二水合磷酸二氢钠	ph Eur/BP/USP/JPE/E339	默克 (Merck)	1.06345.9026	K93518945
二水合磷酸氢二钠	ph Eur/BP/USP	默克 (Merck)	1.06576.9029	K45710476
一水合柠檬酸	ph Eur/BP/JP/USP/E330	默克	1.00242.5000	K48745442711
二水合柠檬酸三钠	ph Eur/BP/JP/USP/E331	默克	1.06432.5000	K93697932
乙酸	EP/BP/JP/USP	贝克 (JTBaker)	9526-03	0000084970
乙酸钠， 三水合物	bio ph Eur/BP/JP/USP	默克	1.37012.9029	AM1027312
EDTA	USP	贝克 (J.T.Baker)	8995-01	0000172864
NaCl	EP/BP/USP/JP	默克	1.16224.5000	K47447424
聚山梨醇酯 80	多药典的	NOF	NA	704352A
蔗糖	多药典的	Pfanstiehl	S-124-1-MC	36920A

[0179]	甘氨酸	CHP	天津天药 (Tianjin Tianyao)	NA	AGLY16 0124
	山梨糖醇	USP	默克	1.11597.25 00	M852697 705

	说明	供应商	目录号	批次号
	20 mL 超滤离心管	赛多利斯斯泰帝 (Sartorius Stedim)	VS2022	1709032VS/18 02014VS
	2 R 小瓶	肖特(Schott) (苏州)	V002711080D	6104481548
[0180]	6 R 小瓶	肖特(苏州)	V006111112C/11 42196	6104358817
	13 mm 橡皮塞	西氏(West) (美国)	1970-0004	D000063205
	20 mm 橡皮塞	西氏(新加坡)	7002-2354	3172022309
	13 mm 塑料-铝盖	西氏(美国)	5413-0921	0000928228
	20 mm 塑料-铝盖	西氏(印度)	5420-3627	00001235077

[0181] 这些抗Cx43抗体制剂开发研究的目的是开发可行的、稳定的液体制剂，支持抗Cx43 Ab药品的长期储存。这些研究包括pH/缓冲液筛选、赋形剂和PS80强度筛选。通过冷冻/解冻、搅拌和加速稳定性研究，评估了缓冲液系统、pH、赋形剂和PS80对产品稳定性的影响。

[0182] pH/缓冲液筛选研究表明，与所研究的其他缓冲液候选物相比，抗Cx43 Ab在pH值为5.5的20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液和pH值为5.5的20mM组氨酸/天冬氨酸缓冲液中更稳定。

[0183] 赋形剂和PS80强度筛选研究表明，与含有氯化钠、山梨糖醇或甘氨酸的缓冲液相比，在含有蔗糖的组氨酸缓冲液中抗Cx43 Ab相对更稳定。在最佳浓度为0.02%的情况下，加入PS80显著改善了抗Cx43 Ab的稳定性，而加入EDTA对抗Cx43 Ab的稳定性没有显著的改善。

[0184] 在pH 5.5的20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐中，选择25mg/mL的抗Cx43 Ab与8%的蔗糖和0.02% (w/v) PS80进行制剂确认研究。

[0185] 样品编号管理规则

[0186] 样品编号:PPP-YYYYMMNN-X-CC-TT

[0187] PPP代表项目名称的数字部分(本项目为2142)。YYYY、MM和NN分别代表年份、月份和本月样品制备的序列号。

[0188] X代表测试条件。例如,FT和A分别代表冷冻-解冻和搅拌。

[0189] CC代表测试温度。例如,05、25和40分别代表2~8℃、25℃和40℃。

[0190] TT代表测试时间。例如,T0、7D、4W和1M分别代表开始时间、7天、4周和1个月。

[0191] F代表制剂编号。例如,F1和F2分别代表制剂1和制剂2。

[0192] 例如:2142-20180601-25-4W代表2018年6月制备的项目抗Cx43 Ab的第一个样品。该样品在25℃下竖直储存4周。

[0193] 分析方法

[0194] 外观

[0195] 使用YB-2灯箱在黑白背景下检查样品的外观,包括透明度、颜色和可见颗粒。

[0196] pH

[0197] 使用梅特勒-托利多(Mettler Toledo)S40 pH计测量pH。在使用前校准pH计。

[0198] 渗透压

[0199] 渗透压是使用Advanced 2020多样品渗透压计测量的,使用20μL的样品。渗透压计的测试精确度是用290mOsmol/kg的参考值来确认的。

[0200] MFI

[0201] 微流成像(MFI)系统被用于亚可见(sub-visible)颗粒分析。根据用户手册,MFI测试是用超过1.3mL的样品进行的。MFI数据用MVAS软件进行分析。最终数据被报告为不同大小范围的总颗粒数。

[0202] 颗粒物

[0203] 利用HACH颗粒分析仪,在层流柜中测量亚可见颗粒大小和计数。为了避免在检查过程中引入气泡和干扰,所有的样品在测试前都要在柜子里保持至少0.5小时。每个样品四次连续跑样测试,每次1mL。结果以每mL $\geq 10\mu\text{m}$ 和 $\geq 25\mu\text{m}$ 的颗粒平均数表示(方法符合USP<788>注射液中的颗粒物)。

[0204] 蛋白质浓度

[0205] 蛋白质浓度由Thermo UV分光光度计测定。根据朗伯-比尔定律,蛋白质溶液在特定紫外波长下的吸光度值(A)、蛋白质浓度(c)、光路(b)和消光系数(ϵ)之间的关系符合以下公式: $A = \epsilon * b * c$ (A为吸光度值, ϵ 为吸光系数,b为光路,c为浓度)。抗Cx43 Ab的消光系数为 $1.531\text{AU} * \text{mL} * \text{mg}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ 。使用Nanodrop2000分光光度计测量280nm处的UV吸收。

[0206] DSC

[0207] 利用差示扫描量热法(DSC)通过检测样品在热流中的热容来测量蛋白质的热稳定性。具体地,使用DSC测量热转变中点(T_m)和熔化起始(T_m 起始),它们是溶液中蛋白质相对稳定性的指标。用参考缓冲液将样品稀释至1mg/mL。将400μL的参考缓冲液等分试样添加到96孔板的每个奇数孔中,同时将每个样品的400μL等分试样添加到相应的偶数孔中。扫描温度范围为20℃至100℃,扫描速率为200℃/小时。使用MicroCal VP毛细管DSC自动数据分析软件2.0进行数据分析。

[0208] mDSC

[0209] 调制式差示扫描量热法(mDSC)例如通过使用DSC-Q2000系统(TA仪器-水LLC)进

行。全部来自TA仪器的Tzero铝坩埚和Tzero铝盖用于盛装待测样品并通过Tzero压机 (press) 密封坩埚。类似地制备空的Tzero坩埚并用作参考。添加约10 μ L DS, 压平并通过Tzero压机转移到用Tzero盖密封的Tzero坩埚中。校准扫描程序在-60.00 $^{\circ}$ C下平衡5分钟, 然后以5.00 $^{\circ}$ C/分钟的恒定温度速率运行至10.00 $^{\circ}$ C。在通用分析软件包的帮助下进行数据采集和处理。

[0210] cIEF

[0211] 成像毛细管等电聚焦 (iCIEF) 方法基于在pH梯度中的电荷差异分离蛋白质。在外部电场下, 单克隆抗体的电荷变体沿着由两性电解质 (ampholyte) 添加剂形成的连续pH梯度迁移。电荷变体将在pH等于其pI处停止。可以使用软件鉴定和量化解析峰的pI值和相对丰度。主混合物按以下比例制备 (对于一个样品量): 0.5 μ L pI 7.05标志物; 0.5 μ L pI 9.22标志物; 4 μ L两性电解质 (Pharmalyte) 3-10; 35 μ L 1%甲基纤维素; 40 μ L H₂O。一次样品注射的溶液由20 μ L的1.0mg/mL稀释样品和80 μ L预混液 (master mix) 构成。

[0212] SDS卡尺 (还原和非还原)

[0213] SDS-卡尺是一种基于高通量芯片的方法, 主要通过蛋白质的分子大小来分离蛋白质。在测试每个样品之前, 必须进行预处理, 例如与样品缓冲液、SDS和N-乙基马来酰亚胺 (用于非还原) 或二硫苏糖醇 (用于还原) 在70 $^{\circ}$ C下孵育10分钟。然后通过LabChip GXII Touch在635和700nm的激发/发射波长下测试最小体积为42 μ L (最终蛋白质浓度为0.045mg/mL) 的上样混合物。最终结果通过Empower软件进行分析。

[0214] 阳离子交换色谱 (CEX)

[0215] CEX通过根据缓冲溶液中净电荷数的差异分离蛋白质来测量单克隆抗体溶液的电荷异质性。样品在低盐缓冲液中, 在低于等电点的pH的情况下将带有净正电荷, 并将吸附在带负电荷的色谱树脂上。基于电荷异质性, pH梯度用于洗脱不同的蛋白质种类, 带最多正电荷的种类结合最强, 因此需要更高的pH。通过280nm处的紫外吸光度检测不同洗脱的带电荷种类。样品的主峰、酸峰和碱峰的百分比采用峰面积归一化法确定。CEX在Agilent 1260系列Infinity系统和propac WCX-10柱上进行。此处使用的流动相A为16mM 2-甲基哌嗪、16mM咪唑、16mM Tris、pH 5.0 \pm 0.1。流动相B为16mM 2-甲基哌嗪、16mM咪唑、16mM Tris、80mM NaCl、pH=10.9 \pm 0.1。并且流速设置为1mL/分钟。用流动相A将样品稀释至1mg/mL, 并通过梯度增加流动相B的量洗脱100 μ L样品。检测波长设置为280nm。运行时间为60分钟。

[0216] CE-SDS (还原和非还原)

[0217] 非还原毛细管电泳-十二烷基硫酸钠 (CE-SDS) 是一种纯度分析方法, 可根据蛋白质的电泳迁移率分离蛋白质, 其中较小尺寸的蛋白质移动较快, 较大尺寸的蛋白质移动较慢。在这种方法中, 稀释后的蛋白质样品首先用N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 烷基化以防止热诱导片段化, 然后用SDS变性, 然后注入填充有粘性SDS凝胶溶液的无涂层毛细管。蛋白质样品中不同分子大小的成分通过带有PDA检测器的毛细管在220nm处时被检测到。

[0218] 简言之, 使用配备光电二极管阵列检测器的贝克曼库尔特PA800增强 (Beckman Coulter PA800Enhanced) 或PA800Plus仪器进行非还原CE-SDS。通过稀释溶液 (PB-CA) 将样品稀释至4mg/mL, 然后在75 μ L SDS样品缓冲液和5 μ L 100mM NEM存在下在60 $^{\circ}$ C下加热10分钟以进行非还原CE-SDS。使用-5kV注入样品20秒, 然后在-15kV下分离35分钟。在220nm处进行检测。

[0219] 还原毛细管电泳-十二烷基硫酸钠(CE-SDS)是一种纯度分析方法,可根据蛋白质的电泳迁移率分离蛋白质,其中较小尺寸的蛋白质移动较快,较大尺寸的蛋白质移动较慢。在这种方法中,稀释的蛋白质样品首先用SDS变性,然后用 β -巯基乙醇(BME)还原,然后注入填充有粘性SDS凝胶溶液的无涂层毛细管。蛋白质样品中不同分子大小的成分通过带有PDA检测器的毛细管在220nm处时被检测到。

[0220] 简言之,使用配备光电二极管阵列检测器的贝克曼库尔特PA800增强(Beckman Coulter PA800Enhanced)或PA800Plus仪器进行还原CE-SDS。通过稀释溶液(PB-CA)将样品稀释至4mg/mL,然后在75 μ L SDS样品缓冲液和5 μ L 2-巯基乙醇存在下在70 $^{\circ}$ C下加热10分钟以进行还原CE-SDS。使用-5kV注入样品20秒,然后在-15kV下分离35分钟。在220nm处进行检测。

[0221] SEC-HPLC

[0222] 尺寸排阻色谱(SEC)是一种纯度分析方法,可根据大小分离蛋白质。分离后,通过UV检测量化HMW种类、单体和LMW种类的相对百分比。如下执行SEC:如果样品高于10mg/mL,则在SEC分析之前用流动相将其稀释至10mg/mL。将100 μ g样品注入配备TSK凝胶G3000SWXL柱(7.8 \times 300mm,5 μ m粒径)和UV检测器(检测波长:280nm)的Agilent 1260 HPLC系统中。流动相是有300mM氯化钠(pH 6.8 \pm 0.1)的50mM磷酸盐缓冲液。以1mL/分钟的流速应用等度梯度20分钟。

[0223] 实施例2:pH/缓冲液筛选

[0224] pH/缓冲液筛选研究旨在确定抗Cx43 Ab药品制剂的最佳pH/缓冲液系统。本研究的目的是为抗Cx43 Ab药品选择一种具有最大稳定能力的pH/缓冲液系统,用于进一步的制剂开发研究。

[0225] 根据分子pI和缓冲液系统的应用设计了九种pH/缓冲液系统。从50L池中产生抗Cx43 Ab DS(批号:2142S180507Y),配制在20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液中,pH 5.5。然后通过超滤离心将DS分别更换为9种制备的缓冲液。本研究中的抗Cx43 Ab浓度为25mg/mL。样品在25 \pm 2 $^{\circ}$ C和40 \pm 2 $^{\circ}$ C下储存长达4周。在每个时间点及时回收样品并在分析前保持在2 \sim 8 $^{\circ}$ C。本研究进行了外观、pH、Conc_UV280、SEC-HPLC、cIEF、SDS-卡尺(R&NR)、DSC等检测项目。取样方案列于表1。

[0226] 表1.抗Cx43 Ab pH/缓冲液筛选的研究参数

pH/缓冲液编号	样品编号	缓冲液系统	pH	时间 0	在 25±2°C 储存		在 40±2°C 储存	
					2 W	4 W(opt)	2 W	4 W(opt)
B1	2142-20180 601	20 mM 乙酸盐	5.0	x,y,z	x	x,z	x	x,z
B2	2142-20180 602	20 mM 组氨酸/ 天冬氨酸	5.0	x,y,z	x	x,z	x	x,z
B3	2142-20180 603		5.5	x,y,z	x	x,z	x	x,z
[0227] B4	2142-20180 604	20 mM 柠檬酸 盐	5.5	x,y,z	x	x,z	x	x,z
B5	2142-20180 605		6.0	x,y,z	x	x,z	x	x,z
B6	2142-20180 606	20 mM 组氨酸	5.5	x,y,z	x	x,z	x	x,z
B7	2142-20180 607		6.0	x,y,z	x	x,z	x	x,z
B8	2142-20180 608		6.5	x,y,z	x	x,z	x	x,z
B9	2142-20180 609	20 mM 磷酸盐	7.0	x,y,z	x	x,z	x	x,z

[0228] 注：x=外观；SEC-HPLC；cIEF；SDS-卡尺(R&N)；y=DSC；z=pH；Conc_UV280；(opt)=任选的。

[0229] 使用超滤离心装置(30,000MWC0 PES,VIVASPIN 20)进行抗Cx43 Ab DS的缓冲液交换。九种pH/缓冲液系统用于筛选最佳缓冲液系统。表1显示了详细的缓冲液系统。进行多轮超滤,直到交换率超过98%。然后用相应的pH/缓冲液系统将蛋白质浓度调整到25mg/mL。每个样品通过0.22μm过滤器(Millipore Express PES膜)过滤,然后分配到2R小瓶中,填充

量为1mL/小瓶。小瓶在填充后立即塞住、密封并贴上标签。所有过滤、填充和密封操作均在生物安全罩中进行。

[0230] 每个pH/缓冲液系统样品的适当数量的小瓶分别放置在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 的稳定箱中。在预定的时间点抽取样品并进行分析。

[0231] 图1显示了不同缓冲液系统中的抗Cx43抗体的热分析图。 T_m 起始,即mAb开始去折叠的温度,被认为是整体热稳定性的指标。

[0232] 如表2所示,B2和B8样品的 T_m 起始比其他的低。这表明,除B2和B8外,抗Cx43 Ab的热稳定性没有受到其他pH/缓冲液系统的显著影响。

[0233] 表2.抗Cx43 Ab pH/缓冲液筛选研究的DSC数据

pH/缓冲液编号	pH/缓冲液	T_m 起始 ($^\circ\text{C}$)	T_{m1} ($^\circ\text{C}$)	T_{m2} ($^\circ\text{C}$)
B1	A5.0	59.8	65.6	73.0
B2	H-D5.0	52.3	62.6	72.4
B3	H-D5.5	57.9	65.3	72.9
B4	C5.5	58.9	66.4	72.5
B5	C6.0	57.6	72.6	/
B6	H5.5	57.0	64.0	72.1
B7	H6.0	60.0	67.3	73.2
B8	H6.5	55.2	69.5	73.5
B9	P7.0	62.4	72.4	/

[0235] 注:A5.0:20mM乙酸盐/乙酸钠缓冲液,pH5.0;H-D-5.0:20mM组氨酸/天冬氨酸缓冲液,pH5.0;H-D-5.5:20mM组氨酸/天冬氨酸缓冲液,pH5.5;C5.5:柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液,pH5.5;C6.0:柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液,pH6.0;H5.5:20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液,pH5.5;H6.0:20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液,pH6.0;H6.5:20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液,pH6.5;P7.0:20mM磷酸氢二钠/磷酸二氢钠缓冲液,pH7.0。

[0236] 表3和表4总结了抗Cx43 Ab在不同缓冲液系统中的外观、蛋白浓度和pH结果。

[0237] 9个样品的浓度约为25mg/mL,pH值在目标pH左右。所有的样品在T0时都是无色的,微乳白色,没有可见颗粒,而B4、B5和B9样品的乳白色水平比其他的深。在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 储存2周后,由于没有PS80,所有样品中都发现了轻微可见颗粒。

[0238] 这一数据表明,抗Cx43 Ab在B1、B2、B3、B6、B7和B8 pH/缓冲液系统中比其他候选者相对更稳定。

[0239] 表3.pH/缓冲液筛选研究的蛋白质浓度和pH结果

pH/缓冲液编号	pH/缓冲液	蛋白质浓度 mg/mL			pH		
		T0	25-4W	40-4W	T0	25-4W	40-4W
B1	A5.0	24.6	24.9	25.0	5.1	5.2	5.1
B2	H-D5.0	24.8	25.0	24.8	5.1	5.2	5.2
[0240] B3	H-D5.5	25.0	25.0	25.3	5.5	5.6	5.6
B4	C5.5	25.3	25.4	25.3	5.5	5.4	5.4
B5	C6.0	25.9	25.8	25.8	5.9	5.8	6.0
B6	H5.5	26.0	26.1	26.1	5.5	5.7	5.6
B7	H6.0	25.2	25.4	25.3	6.0	6.1	6.1
B8	H6.5	24.9	25.2	25.1	6.5	6.5	6.5
B9	P7.0	25.6	25.7	25.7	7.0	6.9	6.9

[0241] 表4.pH/缓冲液筛选研究的外观结果

pH/缓冲液编号	pH/缓冲液	外观				
		T0	25-2W	25-4W	40-2W	40-4W
B1	A5.0	A*	B*	B	B	B
B2	H-D5.0	A	B	B	B	B
[0242] B3	H-D5.5	A	B	B	B	B
B4	C5.5	A	B	B	B	B
B5	C6.0	A	B	B	B	B
B6	H5.5	A	B	B	B	B
B7	H6.0	A	B	B	B	B
B8	H6.5	A	B	B	B	B
B9	P7.0	A	B	B	B	B

[0243] 注:A=无色,微乳白色,无可见颗粒;B=无色,微乳白色,轻微可见颗粒。

[0244] 所有样品的SEC-HPLC结果见表5和图2。

[0245] 所有样品的SEC纯度相当,主峰在T0时约为97%。在25℃下孵育4周后,所有样品的主峰纯度没有明显下降。在40℃下储存2周后,主峰有轻微的下降。在40℃下孵育4周后,主峰的下降幅度在0.4%~2.4%之间。除B9外,各样品之间的差异并不显著。B9样品的纯度下降为2.4%。

[0246] SEC数据表明,抗Cx43 Ab在B2、B3和B6中相对更稳定。

[0247] 表5.pH/缓冲液筛选研究的SEC-HPLC结果

纯度	pH/缓冲液编号	SEC-HPLC 结果				
		T0	25-2W	25-4W	40-2W	40-4W
主峰%	B1	97.2	97.2	97.1	96.7	96.5
	B2	97.3	97.3	97.3	96.9	96.8
	B3	97.3	97.3	97.3	97.1	96.9
	B4	97.3	97.2	97.1	96.7	96.3
	B5	97.3	97.1	97.1	96.7	96.2
	B6	97.4	97.4	97.3	97.1	96.8
	B7	97.4	97.3	97.2	97.1	96.8
	B8	97.4	97.2	97.1	97.0	96.7
	B9	97.2	96.8	96.6	96.0	94.8
HMW 峰%	B1	2.8	2.8	2.9	3.2	3.5
	B2	2.7	2.7	2.7	3.0	3.2
	B3	2.7	2.7	2.7	2.9	3.1
	B4	2.7	2.8	2.9	3.3	3.7
	B5	2.7	2.9	2.9	3.3	3.7
	B6	2.6	2.7	2.7	3.0	3.2
	B7	2.6	2.7	2.8	2.9	3.1
	B8	2.6	2.8	2.9	3.0	3.3
	B9	2.8	3.3	3.4	4.0	5.1
LMW 峰%	B1	ND	ND	ND	0.1	ND
	B2	ND	ND	ND	0.1	0.1
	B3	ND	ND	ND	ND	ND
	B4	ND	ND	ND	ND	ND
	B5	ND	ND	ND	ND	0.1
	B6	ND	ND	ND	ND	ND
	B7	ND	ND	ND	ND	ND
	B8	ND	ND	ND	ND	ND
	B9	ND	ND	ND	ND	ND

[0249] cIEF用于确定抗Cx43 Ab的等电点(pI)和电荷变体分布。所有样品的cIEF结果见表6和图3。

[0250] 所有样品的pI值约为8.1,在不同条件下变化不显著。

[0251] 在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 下储存4周后,所有样品的主峰轻微下降。B9样品的主峰下降幅度为

9.7%，是所有样品中最大的。

[0252] 在 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 下储存4周后，所有样品的主峰显著下降，同时酸性峰显著增加。B5、B8和B9的主峰分别下降到42.6%、46.6%和18.5%。相比之下，B3、B4的主峰下降比其他样品相对较小。

[0253] cIEF数据表明，抗Cx43 Ab在B3和B4中相对更稳定。

[0254] 表6.pH/缓冲液筛选研究的cIEF结果

[0255]

纯度	pH/缓冲液编号	cIEF 结果				
		T0	25-2W	25-4W	40-2W	40-4W
主峰%	B1	63.7	63.8	62.8	57.1	51.4
	B2	63.7	63.9	62.4	57.0	51.0
	B3	62.5	64.0	63.4	56.9	52.3
	B4	63.6	65.2	64.5	59.1	52.9
	B5	64.4	64.1	64.1	53.2	42.6
	B6	62.6	64.0	62.4	57.4	51.3
	B7	61.7	63.5	62.4	57.7	50.6
	B8	61.0	63.5	61.7	55.0	46.6
	B9	64.2	57.6	54.5	34.4	18.5
酸性峰%	B1	22.3	21.5	21.9	25.0	30.8
	B2	23.1	21.5	22.9	26.1	30.7
	B3	23.7	21.8	22.0	26.8	32.3
	B4	22.6	21.1	20.8	24.6	30.8
	B5	22.7	22.4	22.2	31.9	43.2
	B6	24.8	22.5	22.9	26.5	32.5
	B7	25.4	22.9	23.4	27.6	35.4

[0256]	碱性峰%	B8	26.0	22.9	24.2	29.3	37.0
		B9	23.0	28.7	31.7	49.9	63.7
	碱性峰%	B1	14.0	14.7	15.3	17.9	17.8
		B2	13.2	14.6	14.8	16.9	18.3
		B3	13.8	14.2	14.6	16.3	15.4
		B4	13.8	13.8	14.7	16.3	16.3
		B5	12.9	13.5	13.8	14.9	14.2
		B6	12.5	13.6	14.7	16.1	16.2
		B7	12.9	13.6	14.1	14.7	14.1
		B8	13.0	13.5	14.1	15.7	16.4
B9	12.8	13.8	13.8	15.7	17.8		

[0257] 所有样品的SDS-卡尺结果示于表7、图4和图5。

[0258] 在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 下储存4周后,所有样品的非还原SDS-卡尺纯度和还原SDS-卡尺纯度没有显著变化。

[0259] 在 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 储存4周后,B4、B5和B9的非还原SDS-卡尺纯度分别下降到86.9%、82.5%和55.2%,大于其他样品。B2和B3的主峰下降比其他样品相对较小。除B4、B5和B9外,所有样品的还原SDS-卡尺纯度都轻微下降。SDS-卡尺数据表明,抗Cx43 Ab在B2、B3和B6中相对更稳定。

[0260] 表7.pH/缓冲液筛选研究的SDS-卡尺结果

pH/缓冲液编号	SDS-卡尺纯度									
	非还原 SDS-卡尺纯度%					还原 SDS-卡尺纯度%				
	T0	25-2W	25-4W	40-2W	40-4W	T0	25-2W	25-4W	40-2W	40-4W
[0261] B1	99.4	98.4	99.1	93.4	91.8	99.5	99.1	99.4	98.3	97.9
B2	99.4	99.1	99.1	95.1	94.1	99.5	99.2	99.4	98.6	98.4
B3	99.5	98.3	99.1	95.0	93.2	99.5	99.1	99.3	98.6	98.2
B4	99.4	98.8	99.2	92.1	86.9	99.4	99.1	99.3	97.5	96.6
[0262] B5	99.4	98.8	99.0	89.4	82.5	99.4	99.0	99.2	96.9	95.4
B6	99.4	98.8	99.2	95.2	91.4	99.4	99.1	99.4	98.6	98.2
B7	99.5	98.8	99.2	94.6	91.7	99.4	99.1	99.4	98.2	97.9
B8	99.4	97.9	99.1	94.0	91.4	99.4	99.0	99.4	98.1	97.7
B9	99.5	95.3	93.6	75.6	55.2	99.4	98.5	98.4	92.1	84.8

[0263] 在这项研究中,设计了在不同pH/缓冲液系统的9种样品,并在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育。基于所有结果,B6 (20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液,pH5.5)和B2 (20mM组氨酸/天冬氨酸缓冲液,pH5.0)的性能优于其他样品。总之,对于进一步研究,pH为5.5的20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液(B6)将作为主要的pH/缓冲液系统,pH为5.0的20mM组氨酸/天冬氨酸缓冲液(B2)将作为备用pH/缓冲液系统。

[0264] 实施例3:赋形剂和PS80强度筛选

[0265] 赋形剂和PS80强度筛选研究的目的是鉴定最稳定的赋形剂,并评估PS80在候选缓冲液系统中对抗Cx43 Ab的最佳强度。

[0266] 选择pH为5.5的20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液(B6),对加入氯化钠、山梨糖醇、甘氨酸、蔗糖、PS80和EDTA进行组合研究。pH为5.0的20mM组氨酸/天冬氨酸缓冲液系统(B2)被用作赋形剂和PS80强度筛选研究的备用缓冲液。设计了8种制剂,如表8所列。

[0267] 表8. 赋形剂和PS80强度筛选研究的制剂候选列表

[0268]

制剂编号	样品编号	pH/缓冲液	PS80 (w/v)	EDTA (w/v)	NaCl (mM)	山梨糖醇 (mM)	甘氨酸 (mM)	蔗糖 (w/v)
F1	2142-201 80801	H5.5	0.02 %	/	150	/	/	/
F2	2142-201 80802			/	/	245	/	/

[0269]	F3	2142-201 80803			/	/	/	260	/
	F4	2142-201 80804			/	/	/	/	8%
	F5	2142-201 80805			0.002 % (0.068 mM)	/	/	/	8%
	F6	2142-201 80806		0.05 %	/	/	/	/	8%
	F7	2142-201 80807		/	/	/	/	/	8%
	F8	2142-201 80808	H-D- 5.5	0.02 %	0.002 %	/	/	/	8%

[0270] 注:H5.5:20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液,pH5.5;H-D-5.0:20mM组氨酸/天冬氨酸缓冲液,pH5.0。

[0271] 制剂冷冻/解冻(-40±5℃/RT)5个循环,在25℃下以300rpm搅拌7天,并分别在2~8℃、25±2℃和40±2℃储存4周。在每个时间点及时回收样品并在分析前保持在2~8℃。针对本研究进行了外观、pH、Conc_UV280、SEC-HPLC、cIEF、SDS-卡尺(R&NR)、MFI等检测项目。表9显示了赋形剂和PS80强度筛选研究的取样条件。

[0272] 表9.抗Cx43 Ab赋形剂和PS80强度筛选的取样和测试计划

[0273]	制剂编号	T0	-40±5℃ /RT 冷冻/ 解冻	300 rpm 25℃ 搅拌	2~8 °C		25±2 °C		40±2 °C	
			5C	7D	4	(8W	2	4	2	4 W
[0274]					W)	W	W	W	
	F1~F8	x,y,z	x	x	x	(x)	x	x	x	x

[0275] 注:x=外观、pH值、SEC-HPLC、cIEF、MFI、SDS-卡尺;z=Conc_UV280、渗透压;()=任选的。

[0276] 抗Cx43抗体DS(批号:2142S180507Y)在pH 5.5的20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液中配制,由50L池产生。每个最终目标制剂的成分都是按照表8所述计算和制备的。使用超

滤离心装置(30,000MWC PES,VIVASPIN 20)进行抗Cx43 Ab DS的缓冲液交换。进行多轮超滤,直到交换率超过98%。然后用相应的制剂缓冲液将蛋白质浓度调整到25mg/mL。每个制剂通过0.22 μ m过滤器(Millipore Express PES膜)过滤,然后分配到6R小瓶中,填充量为4mL/小瓶。小瓶在填充后立即塞住并密封。所有过滤、填充和密封操作均在生物安全罩中进行。

[0277] 按照表9的描述,为每种制剂放置适当数量的小瓶并进行测试。在预定的时间点抽取样品并进行分析。

[0278] 表10总结了冷冻/解冻研究的外观、蛋白质浓度、渗透压和pH值结果。

[0279] 蛋白质浓度和渗透压在T0时都在目标值附近。

[0280] 在5次冷冻/解冻循环(-40 \pm 5 $^{\circ}$ C/RT)后,8个样品的pH值都在目标值附近。样品在T0时都是无色的,微乳白色,没有可见颗粒。5次冷冻/解冻循环(-40 \pm 5 $^{\circ}$ C/RT)后,由于没有PS80,F7样品中发现了大量的可见颗粒。5次冷冻/解冻循环(-40 \pm 5 $^{\circ}$ C/RT)后,F1样品的乳白色水平变深了。

[0281] 该数据表明,抗Cx43 Ab在F2、F4、F5、F6和F8中相对更稳定。

[0282] 表10.冷冻/解冻研究的蛋白质浓度、pH、渗透压和外观结果

编号	蛋白质浓度 mg/mL	渗透压 mOsm/kg	pH		外观	
	T0	T0	T0	FT-5 C	T0	FT-5 C
F1	25.7	323	5.7	5.6	A*	A
F2	25.5	301	5.7	5.5	A	A
F3	25.6	298	5.7	5.5	A	A
F4	25.8	327	5.6	5.4	A	A
F5	25.7	320	5.6	5.4	A	A
F6	25.7	316	5.6	5.5	A	A
F7	25.7	324	5.6	5.4	A	C
F8	24.1	302	5.6	5.5	A	A

[0285] 注:A=无色,微乳白色,无可见颗粒;C=无色,微乳白色,有大量可见颗粒。

[0286] 表11总结了冷冻/解冻的MFI结果。

[0287] 在T0和5次冷冻/解冻循环(-40 \pm 5 $^{\circ}$ C/RT)后,F7的颗粒计数比其他的高很多。

[0288] 表11.冷冻/解冻研究的MFI结果

制剂编号	MFI (计数/mL)					
	ECD $\geq 2 \mu\text{m}$		ECD $\geq 10 \mu\text{m}$		ECD $\geq 25 \mu\text{m}$	
	T0	FT-5C	T0	FT-5C	T0	FT-5C
F1	635	4476	7	19	0	0
F2	2040	3138	10	9	0	2
F3	3266	8473	5	15	0	2
F4	972	1886	10	5	0	0
F5	3890	3006	40	17	0	4
F6	1124	2813	5	9	0	2
F7	4634	83512	266	859	32	22
F8	3761	3992	15	12	0	0

[0290] 所有制剂的SEC-HPLC结果列于表12和图6。

[0291] 在T0时,所有制剂的SEC纯度相似,主峰在97.5%左右。5次冷冻/解冻循环(-40 \pm 5 $^{\circ}$ C/RT)之后,除了F3样品外,所有制剂的SEC主峰纯度相当,都在97.5%左右。F3样品的主峰纯度下降幅度略高,为8.1%。

[0292] 表12. 冷冻/解冻研究的SEC-HPLC结果

制剂编号	SEC-HPLC 结果					
	主峰%		HMW %		LMW %	
	T0	FT-5C	T0	FT-5C	T0	FT-5C
F1	97.5	97.3	2.6	2.7	ND	ND
F2	97.4	97.5	2.6	2.5	ND	ND
F3	97.5	89.4	2.5	10.6	ND	ND
F4	97.4	97.5	2.6	2.5	ND	ND
F5	97.5	97.5	2.6	2.6	ND	ND
F6	97.4	97.5	2.6	2.5	ND	ND
F7	97.4	97.5	2.6	2.5	ND	ND
F8	97.4	97.5	2.6	2.5	ND	ND

[0294] 所有制剂的cIEF结果列于表13和图7。

[0295] 5次冷冻/解冻循环(-40 \pm 5 $^{\circ}$ C/RT)后,所有样品的pI值约为8.1,没有显著的变化。

[0296] 与T0相比,所有样品经过5次冷冻/解冻循环(-40 \pm 5 $^{\circ}$ C/RT)后,主峰、酸性峰和碱性峰的比例也没有显著变化。

[0297] 表13. 冷冻/解冻研究的cIEF结果

制剂编号	cIEF 结果					
	主峰%		酸性峰%		碱性峰%	
	T0	FT-5C	T0	FT-5C	T0	FT-5C
[0298] F1	64.3	64.3	22.1	22.3	13.5	13.4
F2	64.6	64.8	22.0	22.5	13.4	12.7
F3	64.7	64.0	22.0	21.3	13.3	14.7
F4	64.9	64.7	22.3	22.2	12.8	13.1
F5	64.9	64.6	21.8	21.9	13.3	13.5
F6	64.9	65.0	21.8	22.1	13.3	13.0
[0299] F7	65.1	64.7	21.9	22.0	12.9	13.2
F8	64.5	64.7	21.6	21.9	14.0	13.4

[0300] 表14和图8中总结了所有制剂的SDS-卡尺数据。

[0301] 在5次冷冻/解冻循环 ($-40 \pm 5^\circ\text{C}$ /RT) 后,所有制剂在非还原SDS-卡尺或还原SDS-卡尺中显示出相当的纯度。

[0302] 表14. 冷冻/解冻研究的SDS-卡尺结果

制剂编号	SDS-卡尺纯度			
	非还原 SDS-卡尺纯度%		还原 SDS-卡尺纯度%	
	T0	FT-5C	T0	FT-5C
[0303] F1	99.5	99.3	99.6	99.5
F2	99.4	99.3	99.5	99.5
F3	99.5	99.3	99.6	99.5
F4	99.5	99.3	99.6	99.5
F5	99.0	99.2	99.6	99.6
F6	99.5	99.3	99.5	99.6
F7	99.5	99.3	99.6	99.5
F8	99.5	99.3	99.6	99.5

[0304] 表15总结了搅拌研究的外观、蛋白质浓度、渗透压和pH值结果。

[0305] 蛋白质浓度和渗透压在T0时都在目标值附近。

[0306] 除F7外,所有制剂在25°C下以300rpm搅拌7天后,pH值和外观都保持稳定。在25°C下以300rpm搅拌7天后,F7样品中发现了大量的可见颗粒。在25°C下以300rpm搅拌7天后,F1样品的乳白色水平变深。

[0307] 表15. 搅拌研究的蛋白质浓度、pH值、渗透压和外观结果

编号	蛋白质浓度	渗透压	pH		外观		
	mg/mL	mOsm/kg	T0	A-7D	T0	A-7D	
[0308]	T0	T0	T0	A-7D	T0	A-7D	
F1	25.7	323	5.7	5.5	A*	A	
F2	25.5	301	5.7	5.5	A	A	
F3	25.6	298	5.7	5.5	A	A	
F4	25.8	327	5.6	5.4	A	A	
[0309]	F5	25.7	320	5.6	5.4	A	A
F6	25.7	316	5.6	5.4	A	A	
F7	25.7	324	5.6	5.4	A	C	
F8	24.1	302	5.6	5.5	A	A	

[0310] 注:A=无色,微乳白色,无可见颗粒;C=无色,微乳白色,有大量可见颗粒。

[0311] 所有样品的MFI数据列于表16。

[0312] F7的颗粒计数在T0时轻微地高于其他。在25℃下以300rpm搅拌7天后,由于没有PS80,F7的颗粒计数显著增加。除F7外,所有其他样品颗粒计数相似,没有发现增长趋势。

[0313] 表16. 搅拌研究的MFI结果

制剂编号	MFI (计数/mL)						
	ECD ≥2 μm		ECD ≥10 μm		ECD ≥25 μm		
	T0	A-7D	T0	A-7D	T0	A-7D	
F1	635	871	7	4	0	0	
[0314]	F2	2040	3028	10	10	0	2
F3	3266	2242	5	17	0	0	
F4	972	579	10	7	0	0	
F5	3890	1105	40	7	0	0	
F6	1124	697	5	7	0	0	
F7	4634	44532	266	9624	32	2349	
F8	3761	1033	15	10	0	0	

[0315] 所有制剂的SEC-HPLC结果列于表17和图9。

[0316] 在25℃下以300rpm搅拌7天后,所有制剂的SEC主峰纯度都类似地超过97%。

[0317] 表17. 搅拌研究的SEC-HPLC结果

制剂编号	SEC-HPLC 结果					
	主峰%		HMW %		LMW %	
	T0	A-7D	T0	A-7D	T0	A-7D
F1	97.5	97.4	2.6	2.6	ND	ND
F2	97.4	97.4	2.6	2.6	ND	ND
F3	97.5	97.5	2.5	2.5	ND	ND
F4	97.4	97.4	2.6	2.6	ND	ND
F5	97.5	97.5	2.6	2.6	ND	ND
F6	97.4	97.4	2.6	2.6	ND	ND
F7	97.4	97.4	2.6	2.6	ND	ND
F8	97.4	97.4	2.6	2.6	ND	ND

[0319] 所有制剂的cIEF结果列于表18和图10。

[0320] 在25℃以300rpm搅拌7天后,所有样品的pI值约为8.1,变化不显著。

[0321] 在25℃下以300rpm搅拌7天后,所有制剂的SEC主峰纯度保持稳定。

[0322] 表18. 搅拌研究的cIEF结果

制剂编号	cIEF 结果					
	主峰%		酸性峰%		碱性峰%	
	T0	A-7D	T0	A-7D	T0	A-7D
F1	64.3	64.3	22.1	22.0	13.5	13.7
F2	64.6	64.2	22.0	22.4	13.4	13.4
F3	64.7	64.0	22.0	22.1	13.3	13.9
F4	64.9	64.6	22.3	21.9	12.8	13.5
F5	64.9	64.1	21.8	21.9	13.3	14.0
F6	64.9	63.8	21.8	22.4	13.3	13.8
F7	65.1	64.0	21.9	21.9	12.9	14.1
F8	64.5	64.5	21.6	21.9	14.0	13.6

[0324] 表19和图11中列出了所有制剂的SDS-卡尺结果。

[0325] 在25℃下以300rpm搅拌7天后,所有制剂在非还原SDS-卡尺或还原SDS-卡尺中显示出相当的纯度。

[0326] 表19. 搅拌研究的SDS-卡尺结果

制剂编号	SDS-卡尺纯度			
	非还原 SDS-卡尺纯度%		还原 SDS-卡尺纯度%	
	T0	A-7D	T0	A-7D
F1	99.5	99.2	99.6	99.5
F2	99.4	99.3	99.5	99.5
F3	99.5	99.3	99.6	99.6
F4	99.5	99.3	99.6	99.4
F5	99.0	99.3	99.6	99.5
F6	99.5	99.2	99.5	99.5
F7	99.5	99.3	99.6	99.4
F8	99.5	99.2	99.6	99.5

[0327]

[0328] 表20和表21总结了加速稳定性研究的外观、蛋白质浓度、渗透压和pH值的结果。

[0329] 蛋白质浓度和渗透压在T0时都在目标值附近。

[0330] 在2~8℃、25±2℃或40±2℃储存4周后,所有制剂的pH值保持不变,而在F7中由于没有PS80,发现了轻微可见的颗粒。

[0331] 表20. 加速稳定性研究的外观结果

制剂编号	外观					
	T0	05-4W	25-2W	25-4W	40-2W	40-4W
F1	A*	A	A	A	A	A
F2	A	A	A	A	A	A
F3	A	A	A	A	A	A
F4	A	A	A	A	A	A
F5	A	A	A	A	A	A
F6	A	A	A	A	A	A
F7	A	B	B	B	B	B
F8	A	A	A	A	A	A

[0332]

[0333]

[0334] 注:A=无色,微乳白色,不含可见颗粒;B=无色,微乳白色,轻微可见颗粒。

[0335] 表21. 加速稳定性研究的蛋白质浓度、渗透压和pH结果

[0336]

编号	浓度 (mg/ ml)	渗透压 (mOsm/ kg)	pH					
	T0	T0	T0	05-4 W	25-2 W	25-4W	40-2 W	40-4W
F1	25.7	323	5.7	5.6	5.6	5.6	5.5	5.6
F2	25.5	301	5.7	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
F3	25.6	298	5.7	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
F4	25.8	327	5.6	5.5	5.5	5.4	5.5	5.5
F5	25.7	320	5.6	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
F6	25.7	316	5.6	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
F7	25.7	324	5.6	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
F8	24.1	302	5.6	5.6	5.5	5.6	5.4	5.6

[0337] 所有样品的MFI数据列于表22。

[0338] 在2~8℃和25±2℃储存4周后,所有制剂中的亚可见颗粒计数没有明显变化。

[0339] 在40±2℃储存4周后,F7中的亚可见颗粒计数(ECD≥10μm和ECD≥25μm)的增加远远高于其他制剂,而且F7的颗粒计数有轻微增长趋势。

[0340] 表22. 加速稳定性研究的MFI结果

大小分布	编号	T0	05-4 W	25-2 W	25-4 W	40-2 W	40-4 W
ECD $\geq 2 \mu\text{m}$	F1	635	1433	949	1448	1874	8868
	F2	2040	1417	9376	1930	1248	1369
	F3	3266	2541	1079	841	3733	1073
	F4	972	689	1660	2003	902	687
	F5	3890	1122	688	2525	931	626
	F6	1124	1169	307	1479	989	563
	F7	4634	4742	2191	4021	3104	3872
	F8	3761	881	73	1825	1199	1104
ECD $\geq 10 \mu\text{m}$	F1	7	15	5	14	7	86
	F2	10	12	17	15	4	12
	F3	5	30	5	4	19	12
	F4	10	9	5	5	2	0
	F5	40	4	0	7	4	2
	F6	5	14	9	7	14	6
	F7	266	181	48	243	368	626
	F8	15	5	5	9	27	5
ECD $\geq 25 \mu\text{m}$	F1	0	0	0	0	0	4
	F2	0	0	2	2	0	5
	F3	0	0	0	0	0	0
	F4	0	0	0	0	0	0
	F5	0	2	0	0	0	0
	F6	0	5	0	2	7	0
	F7	32	10	2	20	53	189
[0342]	F8	0	0	2	0	4	0

[0343] 所有样品的SEC-HPLC数据列于表23和图12。

[0344] 在2~8℃和25±2℃储存4周后,所有制剂中的主峰纯度没有明显变化。

[0345] 在 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 储存2周后,观察到主峰显著下降。在 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 储存4周后,主峰的下降范围为0.3%~6.6%。F1、F6的主峰纯度的下降分别为6.6%和3.0%。相比之下,F5和F8的主峰下降比其他制剂相对较小。

[0346] 表23. 加速稳定性研究的SEC-HPLC结果

制剂编号		SEC-HPLC 结果					
		T0	05-4W	25-2W	25-4W	40-2W	40-4W
主峰%	F1	97.5	97.4	97.3	97.3	95.9	90.9
	F2	97.4	97.4	97.4	97.4	97.1	96.7
	F3	97.5	97.4	97.4	97.3	96.2	95.0
	F4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.1	95.5
	F5	97.5	97.4	97.4	97.4	97.2	97.1
	F6	97.4	97.4	97.4	97.3	96.5	94.4
	F7	97.4	97.4	97.4	97.4	97.3	97.0
	F8	97.4	97.4	97.4	97.4	97.2	97.1
HMW %	F1	2.6	2.6	2.7	2.7	4.1	9.1
	F2	2.6	2.6	2.6	2.6	2.9	3.3
	F3	2.5	2.6	2.6	2.7	3.8	5.0
	F4	2.6	2.6	2.6	2.7	2.9	4.5
	F5	2.6	2.6	2.6	2.6	2.8	3.0
	F6	2.6	2.6	2.6	2.7	3.5	5.7
	F7	2.6	2.6	2.6	2.6	2.7	3.0
	F8	2.6	2.6	2.6	2.6	2.8	2.9
LMW %	F1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
[0348]	F4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F8	ND	ND	ND	ND	ND	ND

[0349] 所有样品的cIEF数据列于表24和图13。

[0350] 所有样品的pI值约为8.1,在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 或 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 储存后无显著变化。

[0351] 在2~8℃或25±2℃储存4周后,所有制剂中的主峰纯度没有显著变化。

[0352] 在40±2℃储存4周后,所有样品的主峰纯度显著下降,同时酸性峰显著增加。所有样品的主峰百分比没有显著差异,主峰的下降范围在15.1%-21.1%之间。

[0353] 表24. 加速稳定性研究的cIEF结果

制剂编号		cIEF 结果						
		T0	05-4W	25-2W	25-4W	40-2W	40-4W	
[0354]	主峰%	F1	64.3	64.7	62.9	63.0	57.2	48.8
		F2	64.6	63.8	63.9	62.6	56.6	44.3
		F3	64.7	64.3	63.4	62.0	55.2	43.6
		F4	64.9	63.5	63.4	62.4	56.2	49.8
		F5	64.9	63.7	63.3	62.8	56.6	45.9
		F6	64.9	64.1	63.4	61.9	55.7	49.8
		F7	65.1	63.7	63.2	62.2	56.8	45.5
		F8	64.5	63.7	64.0	62.6	57.4	45.2
	酸性峰%	F1	22.1	22.4	22.4	22.9	26.6	36.0
		F2	22.0	23.1	22.2	23.3	27.3	40.0
		F3	22.0	22.6	22.6	23.5	28.9	41.8
		F4	22.3	23.3	22.4	23.1	26.6	34.9
		F5	21.8	22.8	22.6	22.7	26.2	37.3
[0355]		F6	21.8	22.8	22.7	23.6	28.1	35.3
		F7	21.9	23.0	22.7	23.3	26.4	38.3
		F8	21.6	23.2	21.4	23.2	26.2	39.0
	碱性峰%	F1	13.5	13.0	14.7	14.0	16.2	15.2
		F2	13.4	13.1	14.0	14.1	16.1	15.8
		F3	13.3	13.2	14.0	14.5	15.9	14.6
		F4	12.8	13.2	14.2	14.4	17.2	15.4
		F5	13.3	13.5	14.1	14.5	17.2	16.8
		F6	13.3	13.1	14.0	14.5	16.2	14.9
		F7	12.9	13.3	14.1	14.5	16.8	16.2
		F8	14.0	13.1	14.6	14.2	16.4	15.8

[0356] 所有样品的SDS-卡尺数据列于表25、图14和图15。

[0357] 在2~8℃或25±2℃储存4周后,所有制剂的非还原SDS-卡尺和还原SDS-卡尺纯度

相当。

[0358] 在 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存4周后,所有制剂的非还原SDS-卡尺和还原SDS-卡尺的纯度显著下降。F1和F3的非还原性纯度下降了7.2%和7.3%,是所有制剂中下降最多的。F1、F3和F6的还原纯度分别下降2.7%、2.3%和2.2%。F2、F5和F7的非还原SDS-卡尺纯度或还原SDS-卡尺纯度的下降相对低于其他制剂。

[0359] 表25. 加速稳定性研究的SDS-卡尺结果

制剂编号		SDS-卡尺纯度						
		T0	05-4 W	25-2 W	25-4 W	40-2 W	40-4W	
[0360]	非还原 SDS-卡尺纯度%	F1	99.5	99.2	99.4	99.1	95.5	92.3
		F2	99.4	99.3	99.4	99.1	96.0	94.0
		F3	99.5	99.3	99.3	99.1	94.5	92.2
		F4	99.5	99.3	99.4	99.1	95.9	93.8
		F5	99.0	99.3	99.3	99.1	95.7	94.0
[0361]	非还原 SDS-卡尺纯度%	F6	99.5	99.3	99.3	99.0	95.7	93.9
		F7	99.5	99.3	99.4	99.1	95.7	94.1
		F8	99.5	99.3	99.3	99.1	95.9	93.9
	还原 SDS-卡尺纯度%	F1	99.6	99.6	99.4	99.5	99.5	96.9
		F2	99.5	99.6	99.4	99.5	99.4	98.2
		F3	99.6	99.6	99.5	99.5	98.7	97.3
		F4	99.6	99.6	99.4	99.5	98.8	97.6
		F5	99.6	99.6	99.4	99.5	98.2	98.4
		F6	99.5	99.6	99.4	99.4	98.8	97.3
		F7	99.6	99.6	99.4	99.5	98.9	98.4
		F8	99.6	99.6	99.4	99.5	98.5	98.3

[0362] 5次冷冻/解冻循环($-40\pm 5^{\circ}\text{C}$ /RT)后,所有制剂中的抗Cx43 Ab在蛋白质浓度、pH值、渗透压和(还原和非还原SDS-卡尺)纯度方面没有显著差异。F7(无PS80)中的可见颗粒和亚可见颗粒计数(MFI)远远高于其他制剂。F3样品的SEC主峰显示出略高的下降率,为8.1%。5次冷冻/解冻循环($-40\pm 5^{\circ}\text{C}$ /RT)后,F1样品的乳白色水平变深了。

[0363] 在 25°C 下以300rpm搅拌7天后,所有制剂中的抗Cx43 Ab在蛋白质浓度、pH值、渗透压和(SEC-HPLC、cIEF、还原和非还原SDS-卡尺)纯度方面没有显著差异。F7(无PS80)中的可见颗粒和亚可见颗粒计数(MFI)远远高于其他制剂。在 25°C 下以300rpm搅拌7天后,F1样品的乳白色水平变深。

[0364] 在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 储存4周后,所有制剂中的抗Cx43 Ab在蛋白质浓度、pH值、渗透压、亚可

见颗粒和 (SEC-HPLC、cIEF、还原和非还原SDS-卡尺) 纯度方面没有显著差异。在2~8℃下储存4周后, F7中只发现了轻微可见的颗粒。

[0365] 在25±2℃储存4周后, 所有制剂中的抗Cx43 Ab在蛋白质浓度、pH值、渗透压、亚可见颗粒和 (SEC-HPLC、还原和非还原SDS-卡尺) 纯度方面没有显著差异。此外, 由于无PS80, 在制剂F7中发现了轻微可见的颗粒。所有样品的cIEF主峰轻微下降, 但在25±2℃下储存4周后, 8种制剂没有发现显著差异。

[0366] 在40±2℃下储存4周后, 所有制剂中的抗Cx43 Ab在蛋白质浓度、pH值和渗透压方面没有显著差异。由于无PS80, 在制剂F7中发现了轻微可见的颗粒。F7中的亚可见颗粒计数 (ECD≥10μm和ECD≥25μm) 的增加远远高于其他制剂。所有样品的 (SEC-HPLC、cIEF、还原和非还原SDS-卡尺) 纯度显著下降。F1和F6中SEC主峰的下降远高于其他制剂。F5和F8的SEC主峰下降比其他制剂相对轻微。所有样品的cIEF主峰百分比没有显著差异, 主峰的下降范围在15.1%~21.1%之间。F1和F3的 (非还原) SDS-卡尺纯度的下降高于其他制剂。F1的 (还原) SDS-卡尺纯度的下降幅度比其他制剂高。F2、F5和F7的非还原SDS-卡尺纯度或还原SDS-卡尺纯度的下降相对低于其他制剂。

[0367] 总之, 为了确定主要制剂, 我们进行了制剂开发研究, 包括pH/缓冲液筛选、赋形剂和PS80强度筛选。

[0368] 在pH/缓冲液筛选中, 组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液系统表现出最佳的蛋白质稳定化的能力。

[0369] 在赋形剂和PS80强度筛选中, 选择了氯化钠、山梨糖醇、甘氨酸和蔗糖 (F1、F2、F3和F4) 来研究它们对抗Cx43 Ab的稳定化能力。结果表明, 抗Cx43Ab在以蔗糖为赋形剂的组氨酸缓冲液中相对更稳定。含有不同浓度PS80的样品 (F4、F6和F7) 的稳定性数据显示, F4 (含0.02%的PS80) 比F6和F7 (分别含0%或0.05%的PS80) 对抗Cx43 Ab提供更好的稳定化。基于EDTA研究的结果 (F4和F5), EDTA对抗Cx43 Ab没有提供额外的稳定化。

[0370] 最后, 含有8%蔗糖和0.02% (w/v) PS80的pH 5.5的20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐中的25mg/mL抗Cx43 Ab, 被认为是制剂确认研究的主导制剂。

[0371] 实施例4: 制剂确认研究

[0372] 抗Cx43 Ab制剂确认研究是利用最终工艺DS来确认所选制剂的稳定性。确认研究中评估的条件包括长期储存条件、加速条件、压力条件、冷冻/解冻和搅拌。从制剂筛选研究中选出的制剂是含有8% (w/v) 蔗糖和0.02% (w/v) PS80的pH5.5的20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液中的25mg/mL抗Cx43 Ab。

[0373] 表26. 抗Cx43 Ab制剂确认研究的研究参数

[0374]

DP (2142 150mg/6mL/小瓶; 6R 玻璃小瓶)

	2-8 °C		25 °C			40 °C		-40 °C~R T	搅拌 100 rpm
[0375]	1 M	3 M	1 M	2 M	3 M	2wk s	4w ks	FT-5C	25-A -7D
	x	x,z	x	x	x,z	x	x,z	x	x

[0376] 注：x=外观、pH值、渗透压、Conc_UV280、SEC-HPLC、CEX、CE-SDS (R&NR)、HIAC；y=mDSC

[0377] 在制剂确认研究中对主导制剂进行了评估。mAb材料(第1批15L DS)如下配制：25mg/ml蛋白质、含8%蔗糖和0.02% (w/v) PS80的pH 5.5的20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液。在生物安全罩中将配制好的DS用0.22μm的PVDF过滤器过滤，装入6mL的玻璃小瓶中(6.0mL/小瓶)，塞住并密封。

[0378] 将适当数量的小瓶分别置于2~8°C冰箱、25°C和40°C稳定箱中。同时，将瓶子分别在-40°C冰箱中冷冻并在室温下解冻，持续5个循环，或固定在25°C的100rpm恒温摇床上7天。在预定的时间点取回样品并进行分析。

[0379] 图16显示了最终制剂中的抗Cx43 Ab mAb的热分析图。Tg' 起始，即样品开始玻璃转化的温度，被认为是玻璃态形成的指标。抗Cx43 Ab的Tg' 起始为-31.61°C。

[0380] 表27. 抗-Cx43 Ab制剂确认研究的mDSC数据

[0381]	样品ID	Tg' 起始(°C)	Tg' 中间(°C)	Tg' 结束(°C)
	2142-20181201-T0	-31.61°C	-29.74°C	-28.61°C

[0382] 表28总结了冷冻/解冻和搅拌研究的外观、蛋白质浓度、pH和渗透压结果。

[0383] 5次冷冻/解冻循环(-40±5°C/RT)和7天的搅拌后，外观、蛋白质浓度、pH和渗透压没有明显变化。所有的样品看起来都是无色的，微乳白色，无可见颗粒。蛋白质浓度没有观察到明显变化，所有结果都在25.0±2.5mg/mL的规格内。与T0相比，在pH和渗透压测试中没有观察到明显的变化。

[0384] 表28. 冷冻/解冻和搅拌研究的外观、蛋白质浓度、pH和渗透压结果

测试项目 \ 样品 ID	2142-20181201	2142-20181201	2142-20181201
	-T0	-FT-5C	-A-7D
外观	A	A	A
浓度 (mg/mL)	25.1	25.3	25.2
pH	5.6	5.5	5.6
渗透压 (mOSm/kg)	304	310	311

[0386] 注:A=无色,微乳白色,无可见颗粒。

[0387] 表29总结了冷冻/解冻和搅拌研究的颗粒物结果。5次冷冻/解冻循环(-40±5℃/RT)和25℃下7天的搅拌后,没有观察到颗粒计数(ECD≥10μm和ECD≥25μm)的增长趋势。

[0388] 表29.冷冻/解冻和搅拌研究的HIAC数据

测试项目 \ 样品 ID	2142-20181201	2142-20181201	2142-20181201
	1 -T0	-FT-5C	1 -A-7D
HIAC 浓度 (#/ml)	>=2 μm	1814	687
	>= 10 μm	49	9
	>=25 μm	1	1

[0390] 表30总结了冷冻/解冻和搅拌研究的SEC-HPLC结果。5次冷冻/解冻循环后,没有观察到明显的变化。在25℃搅拌7天(100rpm)后,观察到SEC主峰的纯度轻微下降(1.2%)。

[0391] 表30.冷冻/解冻和搅拌研究的SEC数据

[0392]	测试项目 \ 样品 ID	2142-20181	2142-2018120	2142-2018120
		201	1	1
		-T0	-FT-5C	-A-7D
	主峰%	99.4	99.2	98.2
	HMW 峰%	0.6	0.8	1.7
	LMW 峰%	ND	ND	0.1

[0393] 表31总结了冷冻/解冻和搅拌研究的CE-SDS (NR&R) 结果。5次冷冻/解冻循环后，CE-SDS-NR和CE-SDS-R的纯度没有明显变化。在25℃搅拌(100rpm)7天后，观察到CE-SDS-NR纯度(1.0%)和CE-SDS-R纯度(2.1%)轻微下降。

[0394] 表31. 冷冻/解冻和搅拌研究的CE-SDS数据

[0395]	测试项目 \ 样品 ID	2142-2018120	2142-2018120	2142-2018120
		1	1	1
		-T0	-FT-5C	-A-7D
	CE-NR 纯度%	99.5	99.4	98.5
	CE-R 纯度%	97.8	98.0	95.7

[0396] 表32总结了冷冻/解冻和搅拌研究的CEX结果。与T0相比，5次冷冻/解冻循环(-40±5℃/RT)后，主峰、酸性峰和碱性峰的比例没有明显变化。对于在25℃下搅拌(100rpm)7天的样品，观察到主峰的显著减少(多达17.9%)。

[0397] 表32. 冷冻/解冻和搅拌研究的CEX数据

[0398]	测试项目 \ 样品 ID	2142-201812	2142-2018120	2142-2018120
		01	1	1
		-T0	-FT-5C	-A-7D
	主峰%	78.4	77.7	60.5
[0399]	酸性峰%	13.5	13.5	16.3
	碱性峰%	8.1	8.8	23.2

[0400] 表33中总结了不同储存条件下的外观、蛋白质浓度、pH和渗透压结果。除了一个在2~8℃下保存1个月的样品似乎偶然地含有一些可见颗粒以外，所有的样品在不同的储存条件下都没有可见的颗粒。在25℃-1M/2M/3M和40℃-2W/4W时，样品颜色轻微变黄。与T0相

比,蛋白质浓度、pH和渗透压没有明显变化,都在规格范围内。

[0401] 表33. 稳定性研究的外观、蛋白质浓度、pH和渗透压结果

测试项目 \ 样品 ID	T0	2142-20181201-05			2142-20181201-25			2142-20181201-40	
		1M	2M	3M	1M	2M	3M	2W	4W
外观	A	C	A	A	B	B	B	A	B
[0402] 浓度 (mg/mL)	25.1	25.4	25.2	25.1	25.5	25.2	25.2	25.5	25.5
pH	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5
渗透压 (mOSm/kg)	304	296	300	301	301	304	299	303	304

[0403] 注:A=无色,微乳白色,无可见颗粒;B=微黄色,微乳白色,无可见颗粒;C=无色,微乳白色,可见颗粒。

[0404] 表34中总结了不同储存条件下的样品的HIAC结果。在2~8℃、25±2℃和40±2℃下2周,亚可见颗粒计数没有明显变化。由于可见颗粒的产生,在2~8℃下1个月产生的数据作为参考。

[0405] 表34. 稳定性研究中的HIAC数据

测试项目 \ 样品 ID	T0	2142-20181201-05			2142-20181201-25			2142-20181201-40	
		1M	2M	3M	1M	2M	3M	2W	4W
[0406] HIAC 浓度 (#/ml)									
>=2 µm	1814	2620	409	1364	1397	519	1657	498	1288
>=10 µm	49	86	14	24	31	30	33	12	33
>=25 µm	1	2	1	0	1	0	0	1	0

[0408] 表35中总结了不同储存条件下的样品的SEC-HPLC结果。对于在2~8℃孵育的样品,在储存3个月后观察到主峰有轻微下降(主峰下降等于1.1%)。对于在25℃孵育的样品,在储存3个月后观察到主峰有轻微下降(主峰的下降等于2.6%)。对于在40℃孵育的样品,在储存4周后观察到主峰有显著下降(主峰下降等于5.1%)。

[0409] 表35. 稳定性研究的SEC数据

[0410]

测试项目 \ 样品 ID	T 0	2142-20181201-0			2142-20181201			2142-20181201	
		5			-25			-40	
		1 M	2M	3 M	1M	2 M	3 M	2W	4W
主峰%	99.4	98.8	98.4	98.3	98.0	97.2	96.8	96.4	94.3
HMW 峰%	0.6	1.1	1.6	1.6	1.9	2.7	3.1	3.4	5.2
LMW 峰%	ND	<0.1	<0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.5

[0411] 表36显示了不同储存条件下的样品的CE-SDS (NR&R) 结果。对于在2~8℃孵育的样品,在储存3个月后观察到CE-SDS纯度下降(CE_NR主峰下降等于1.3%,CE_R主峰下降等于2.5%)。对于在25℃孵育的样品,在储存3个月后观察到CE-SDS纯度下降(CE_NR主峰下降等于6.1%,CE_R主峰下降等于8.0%)。对于在40℃孵育的样品,在储存4周后观察到CE-SDS纯度下降(CE_NR主峰下降等于12.8%,CE_R主峰下降等于5.8%)。

[0412] 表36. 稳定性研究中的CE-SDS数据

[0413]

测试项目 \ 样品 ID	T 0	2142-20181201-0			2142-20181201-			2142-2018120	
		5			25			1-40	
		1 M	2M	3 M	1M	2 M	3M	2W	4W
CE-NR 纯度%	99.5	99.0	98.7	98.2	95.3	94.9	93.4	93.2	86.7
CE-R 纯度%	97.8	98.4	96.0	95.3	93.8	90.9	89.8	93.9	92.0

[0414] 表37中显示了不同储存条件下的样品的CEX结果。对于在2~8℃下孵育的样品,在储存3个月后观察到主峰减少(CEX主峰的下降等于20.4%)。对于在25℃下孵育的样品,在储存3个月后观察到主峰减少(CEX主峰的下降等于20.0%)。对于在40℃下孵育的样品,在储存4周后观察到主峰减少(CEX主峰的下降等于30.6%)。

[0415] 表37. 稳定性研究中的CEX数据

[0416]

测试项目 \ 样品 ID	T 0	2142-20181201-05			2142-20181201			2142-2018120	
		-05			-25			1-40	
		1 M	2M	3M	1 M	2 M	3M	2W	4W
主峰%	78.4	65.7	61.1	58.0	54.4	56.9	58.4	56.0	47.8
酸性峰%	13.5	14.4	13.4	14.0	20.3	20.9	23.1	28.7	35.6
碱性峰%	8.1	19.8	25.6	27.9	25.2	22.3	18.5	15.2	16.6

[0417] 5次冷冻/解冻循环(-40±5℃/RT)后,所选制剂中的抗Cx43 Ab在外观、蛋白质浓度、pH值、渗透压和(SEC-HPLC、CEX-HPLC、还原和非还原CE-SDS)纯度上没有显著变化。

[0418] 在25℃下搅拌7天后,所选制剂中的抗Cx43 Ab在外观、蛋白质浓度、pH值、渗透压方面没有显著差异。所选制剂的(SEC-HPLC、CEX-HPLC、还原和非还原CE-SDS)纯度轻微下降

[0419] 在2~8℃下储存3个月后,所选制剂中的抗Cx43 Ab在外观、蛋白质浓度、pH值、渗透压和颗粒物方面没有显著变化。所选制剂的(SEC-HPLC、CEX-HPLC、还原和非还原CE-SDS)纯度轻微下降。

[0420] 在25±2℃下储存3个月后,所选制剂中的抗Cx43 Ab在蛋白质浓度、pH值、渗透压和颗粒物方面没有显著变化。样品颜色轻微变黄。在25±2℃储存3个月后,所选制剂的(SEC-HPLC、CEX-HPLC、还原和非还原CE-SDS)纯度下降。

[0421] 在40±2℃储存4周后,所选制剂中的抗Cx43 Ab在蛋白质浓度、pH值、渗透压和颗粒物方面没有显著变化。样品颜色轻微变黄。所选制剂的(SEC-HPLC、CEX-HPLC、还原和非还原CE-SDS)纯度下降。

[0422] 根据确认研究数据,建议将-20℃作为DP储存条件。

[0423] 总之,含有8%蔗糖和0.02%(w/v)PS80的pH5.5的20mM组氨酸/组氨酸盐酸盐缓冲液中25mg/mL蛋白,被认为是抗Cx43 Ab的制剂。根据确认研究数据,建议将-20℃作为DP储存条件。

[0424] 修改

[0425] 对本公开所述方法和组合物的改进和变动对本领域技术人员是显而易见的,而不偏离本公开的范围和精神。虽然已结合具体的优选实施方式对本公开作了描述,但应了解,如权利要求所述,本公开不应过分地受限于这些具体实施方案。实际上,本公开所属领域的相关领域的技术人员意图和理解对所描述的用于实施本公开的方式的各种修改,这些修改落入由所附权利要求所表示的本公开的范围。

[0426] 通过引用纳入

[0427] 本说明书中提到的所有专利和公开通过引用纳入本文,就好像将各篇单独的专利或公开专门和单独地通过引用纳入本文那样。

序列表

<110> 阿拉玛布治疗学股份有限公司 (AlaMab Therapeutics, Inc.)

<120> 抗-连接蛋白抗体制剂

<130> 172628-020501/PCT

<140> US 62/909,267

<141> 2019-10-02

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Ile Asn Pro Ser Asn Ala Gly Thr

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 3

Thr Arg Glu Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Met Asn Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 10
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
	165	170
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
	180	185
Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro		
	195	200
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	245	250
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val		
	260	265
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	325	330
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
	340	345
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
	355	360
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
	405	410
Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
	420	425
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445

<210> 11
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Ala Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 12
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys	Asn	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90						95	
Thr	Arg	Glu	Gly	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Met	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			115				120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
			130			135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165				170						175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195				200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
			210			215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245				250						255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
			275				280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
			290			295				300					
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				325				330					335		
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
			355			360						365			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu

370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
	405	410
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	420	425
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	435	440
		445
Lys		
<210> 13		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> 未知		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 13		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
	20	25
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40
		45
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Ala Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe		
	50	55
		60
Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
		80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
		95
Thr Arg Glu Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100	105
		110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
	115	120
		125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
	130	135
		140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
		160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
	165	170
		175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 14

<211> 446

<212> PRT

<213> 未知

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 15
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Ala Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Glu Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp	145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro	210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe	225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val	260	265	270
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser	325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	340	345	350
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			

	405		410		415										
Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
			420						425					430	
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys		
			435						440					445	
<210>	16														
<211>	446														
<212>	PRT														
<213>	未知														
<220>															
<223>	合成的														
<400>	16														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20						25					30	
Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35						40					45	
Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe
		50					55						60		
Lys	Asn	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70						75				80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85						90				95
Thr	Arg	Glu	Gly	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Met	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100						105					110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115							120					125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu
		130							135					140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145						150					155				160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165						170				175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180								185				190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
		195									200				205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro

210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	245	250
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val		
	260	265
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
	275	280
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	325	330
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
	340	345
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
	355	360
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
	405	410
Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
	420	425
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	435	440
		445

<210> 17

<211> 446

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 18
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 18
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

<220>

<223> 合成的

<400> 22

Phe Leu Gly Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 23

Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys Asp Ile
1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 24

Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys Tyr Ile
1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 25

Phe Leu Ser Arg Trp Thr Glu Lys Thr Ile
1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 26

Phe Leu Ser Arg Pro Ser Glu Lys Thr Ile

1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 27

Phe Leu Asn Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile

1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 28

Phe Leu Ser Arg Pro Phe Glu Lys Thr Ile

1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 29

Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Gly

1 5 10

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成的

<400> 30

Phe Leu Ser Arg Pro

1 5

<210> 31

<211> 5
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 合成的
<400> 31
Leu Ser Arg Pro Thr
1 5
<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 合成的
<400> 32
Ser Arg Pro Thr Glu
1 5
<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 合成的
<400> 33
Arg Pro Thr Glu Lys
1 5
<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 合成的
<400> 34
Pro Thr Glu Lys Thr
1 5
<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 合成的
<400> 35
Thr Glu Lys Thr Ile
1 5
<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 合成的
<400> 36
Phe Leu Ser Arg Pro Thr
1 5
<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 合成的
<400> 37
Leu Ser Arg Pro Thr Glu
1 5
<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 合成的
<400> 38
Ser Arg Pro Thr Glu Lys
1 5
<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 合成的
<400> 39

Arg Pro Thr Glu Lys Thr

1

5

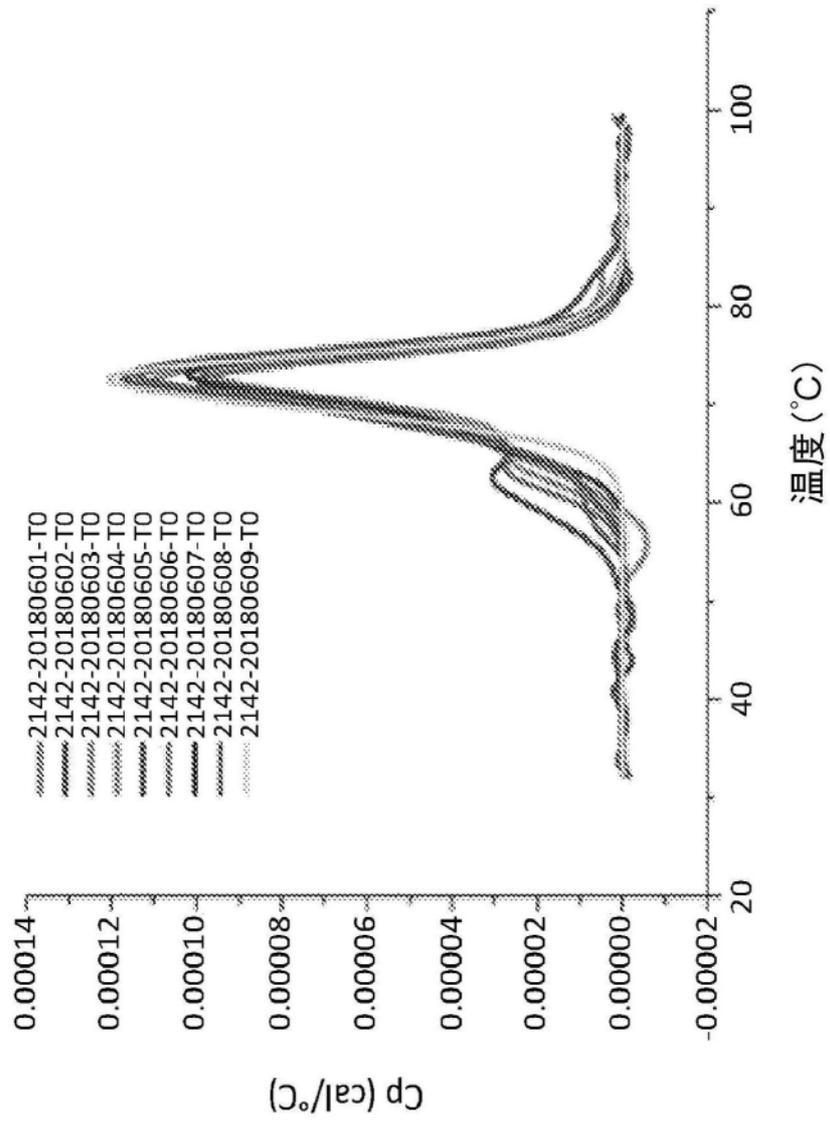


图1

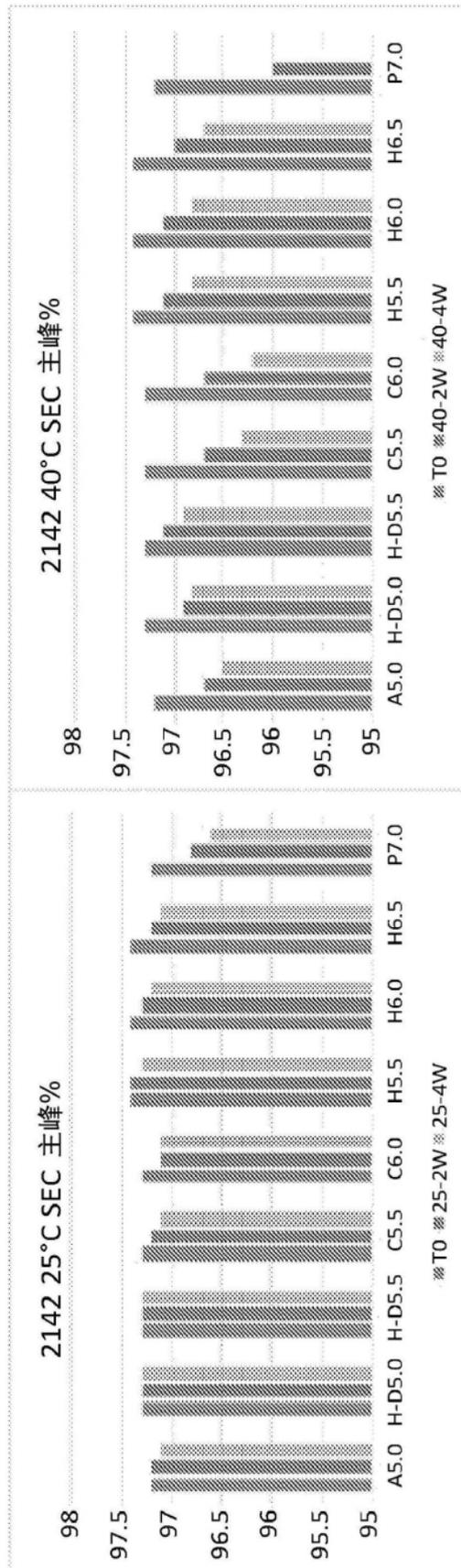


图2

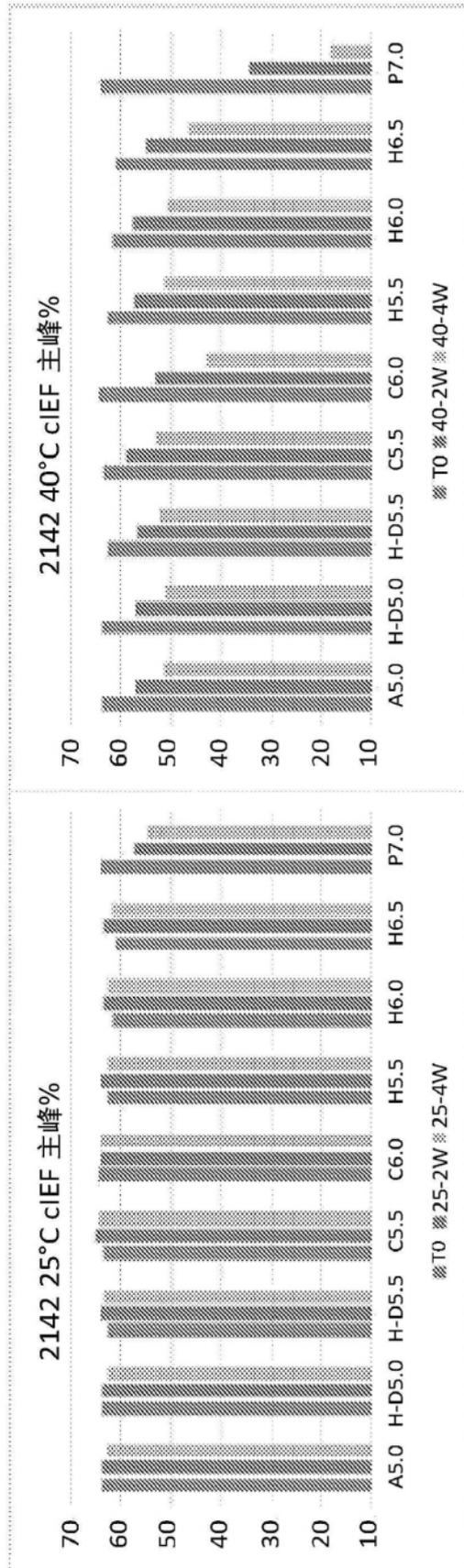


图3

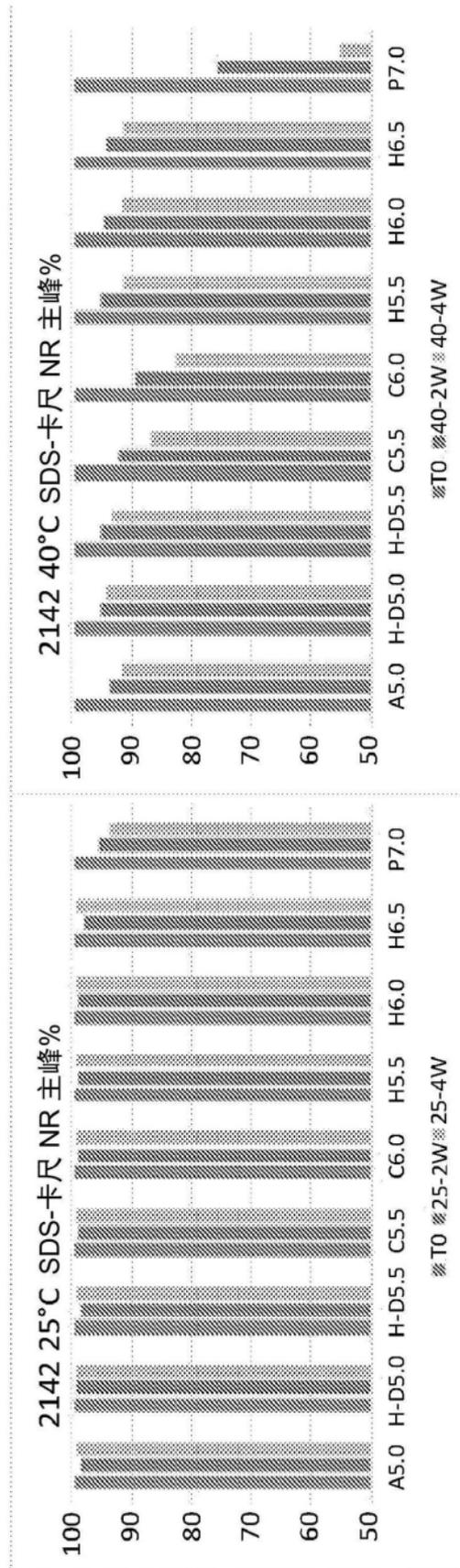


图4

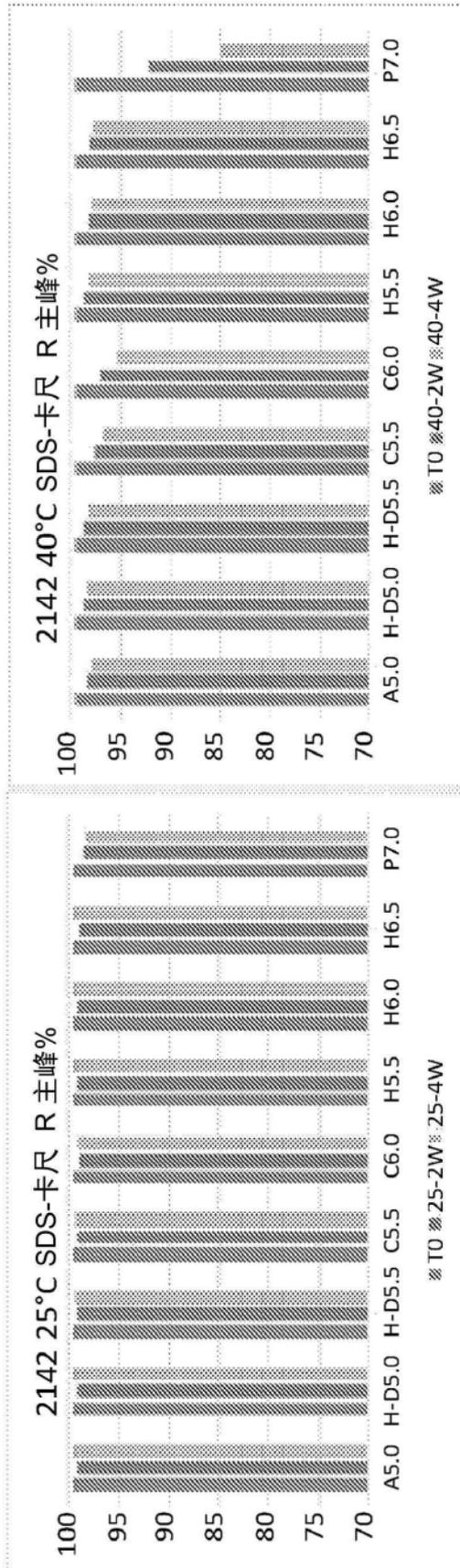


图5

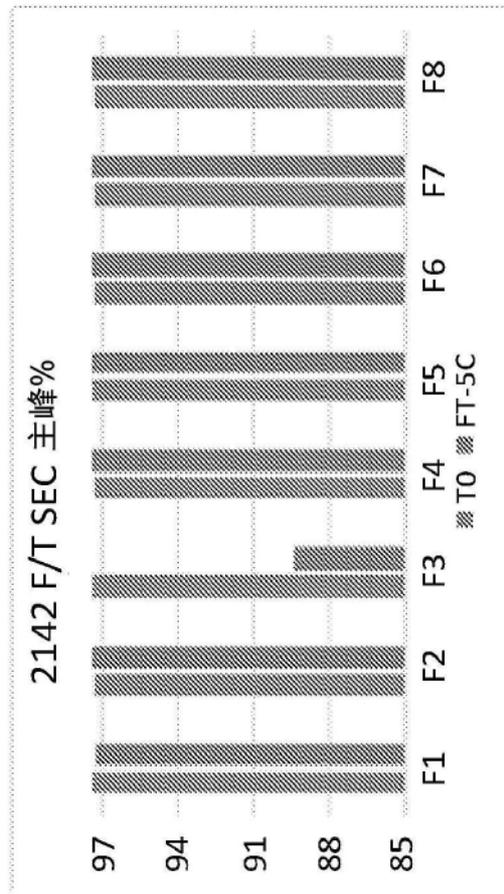


图6

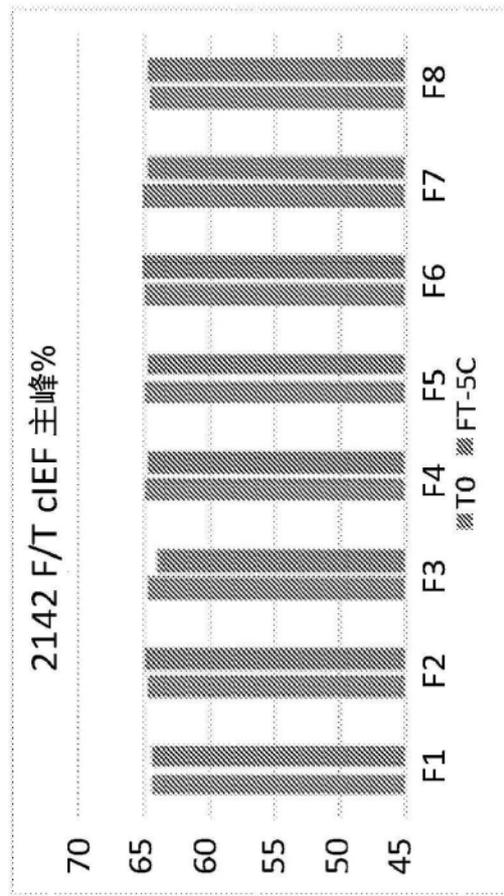


图7

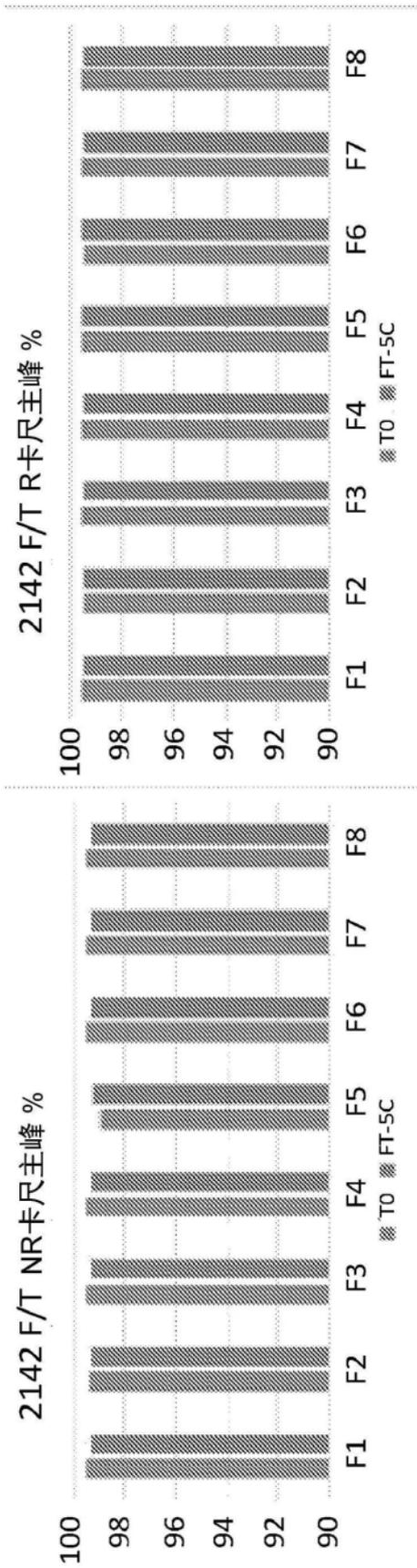


图8

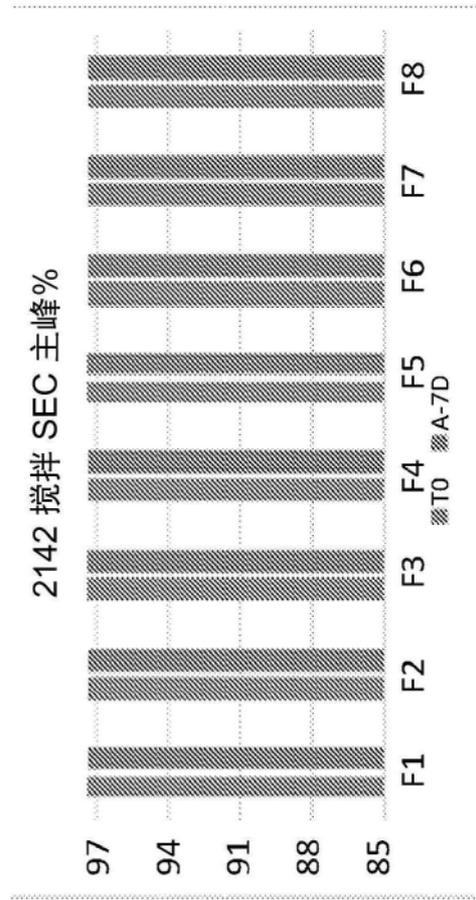


图9

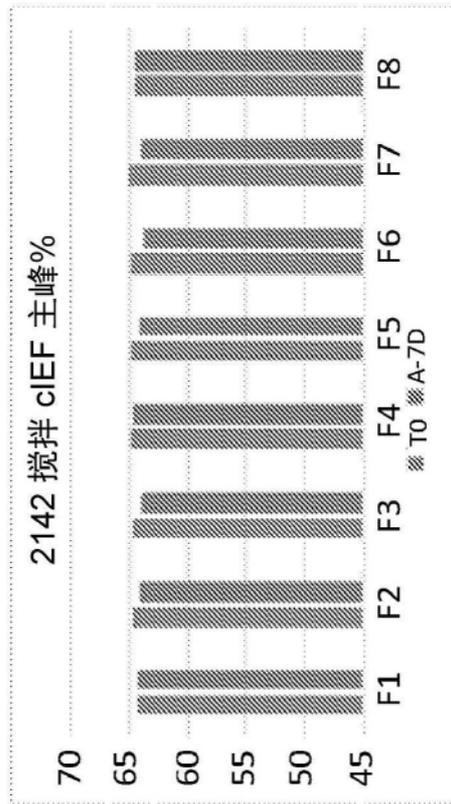


图10

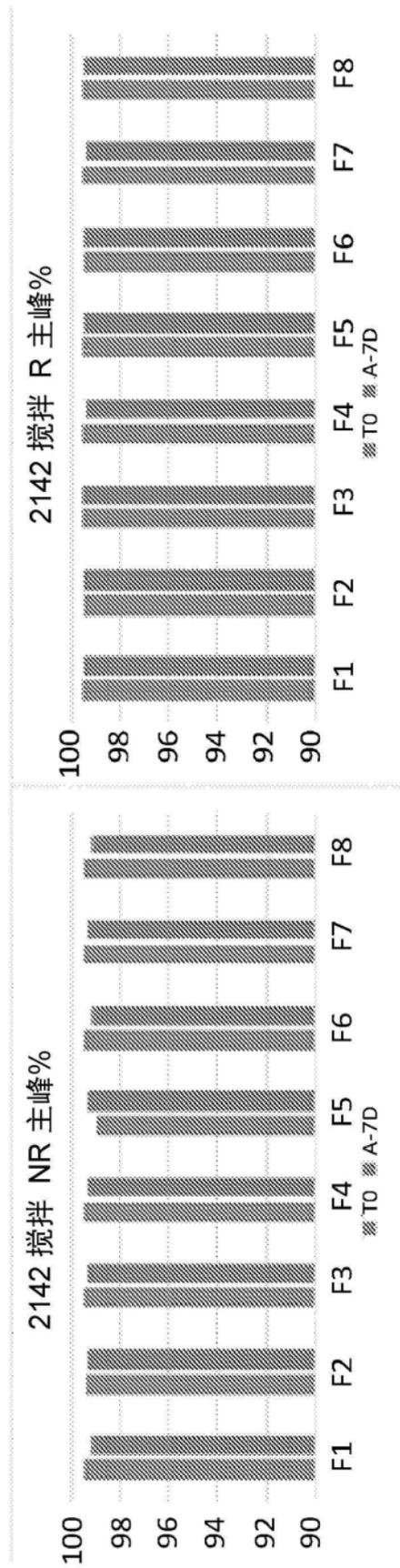


图11

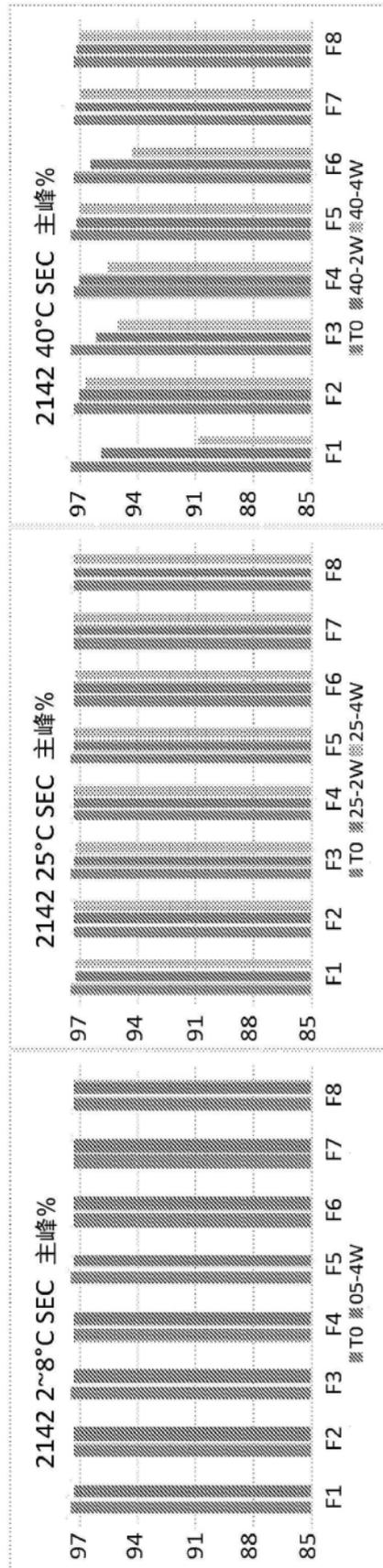


图12

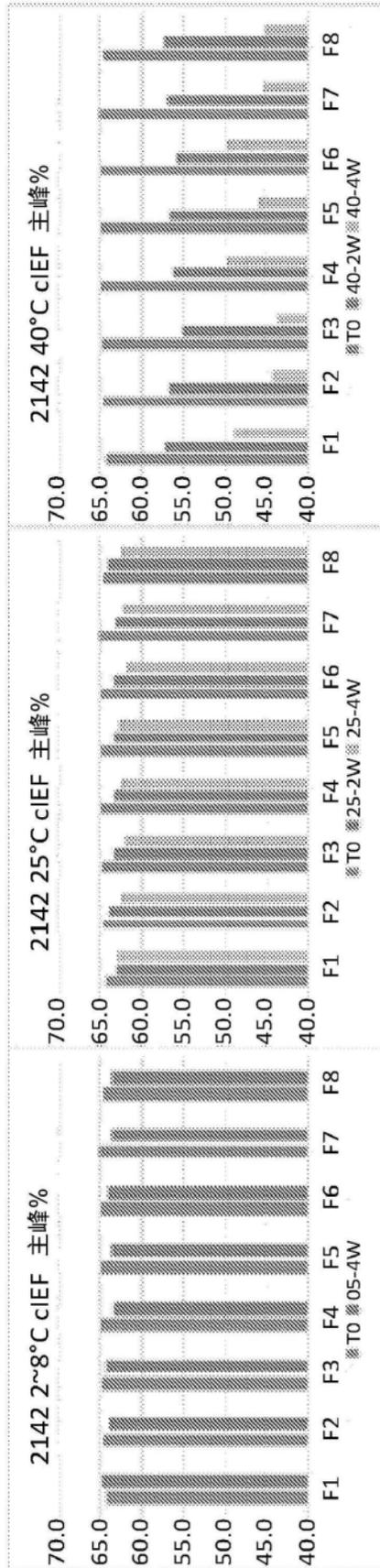


图13

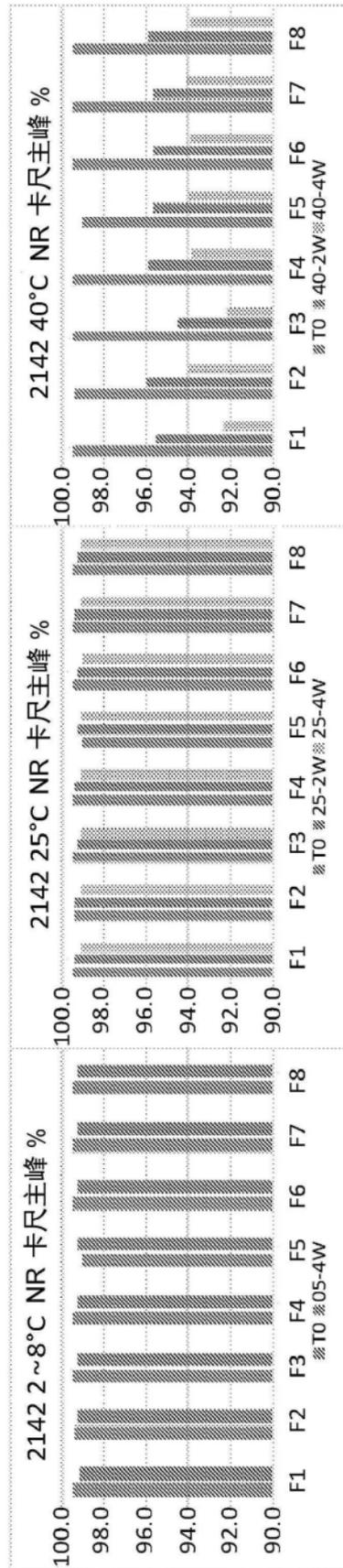


图14

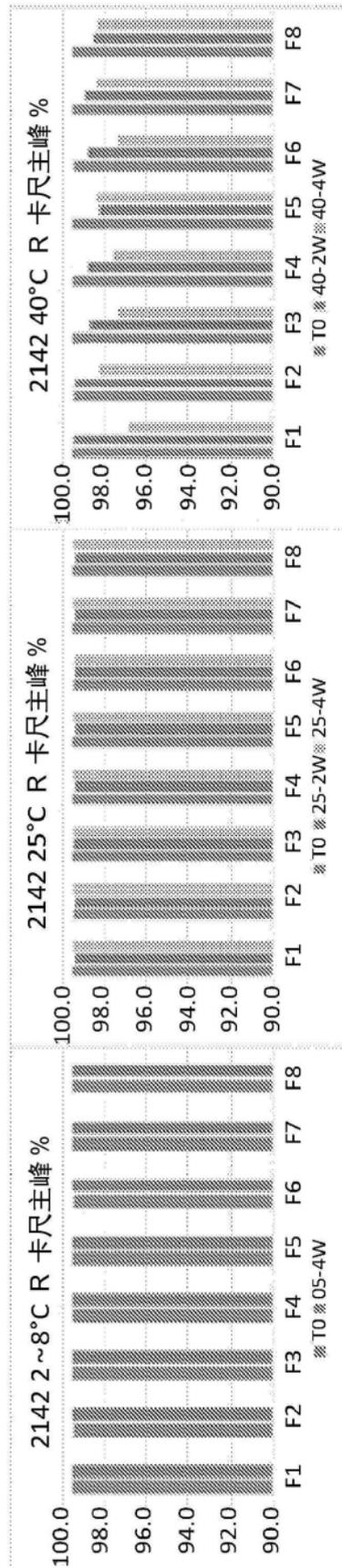


图15

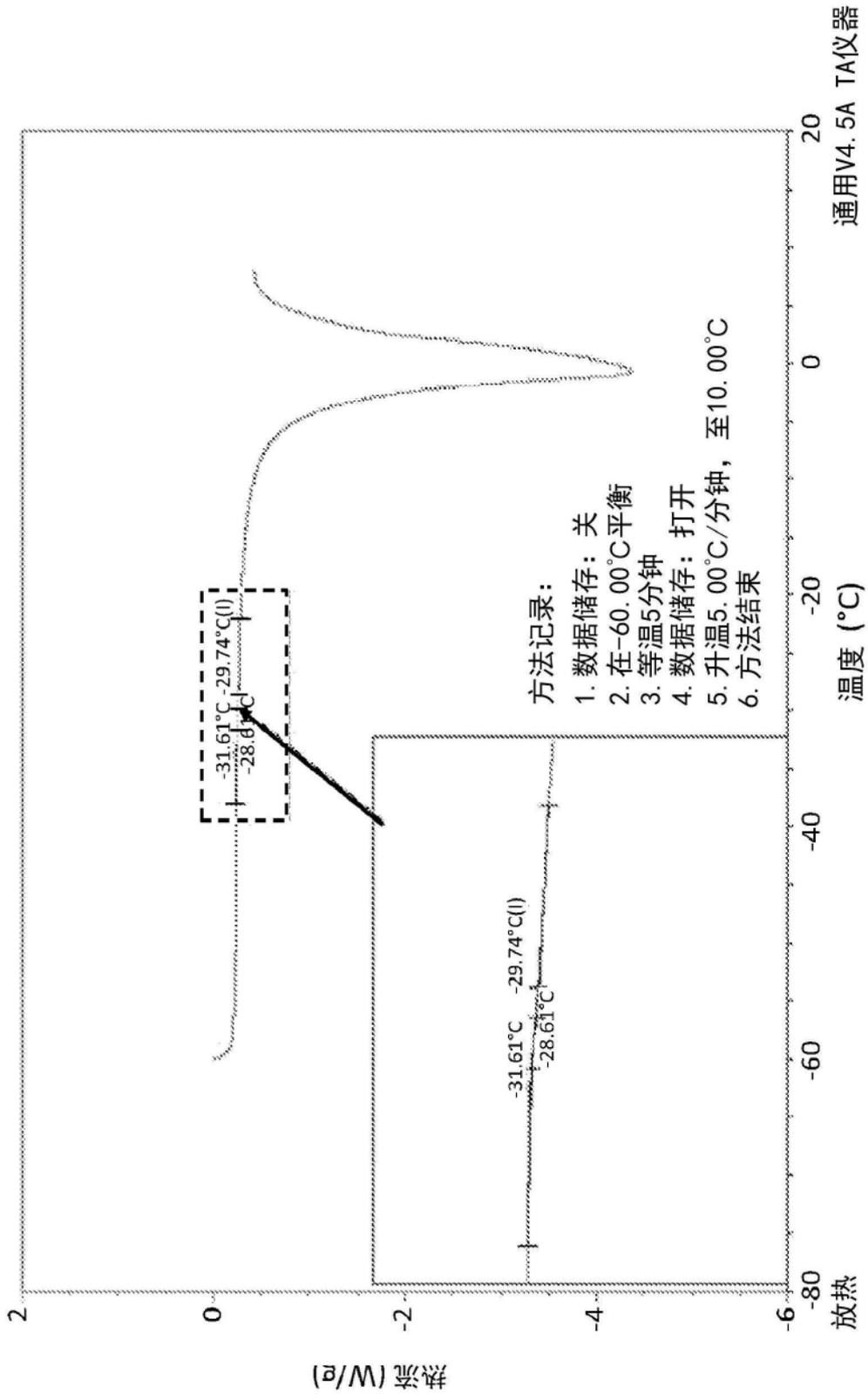


图16