



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107095846 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201610825809.7

A61K 47/26(2006.01)

(22)申请日 2010.12.20

A61K 47/18(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 35/00(2006.01)

61/288,535 2009.12.21 US

A61P 35/04(2006.01)

(62)分案原申请数据

201080064451.1 2010.12.20

(71)申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 Y.R.戈卡恩 T.J.卡莫泽尔 M.李

M.克伦威尔 H.刘

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51)Int.Cl.

A61K 9/08(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

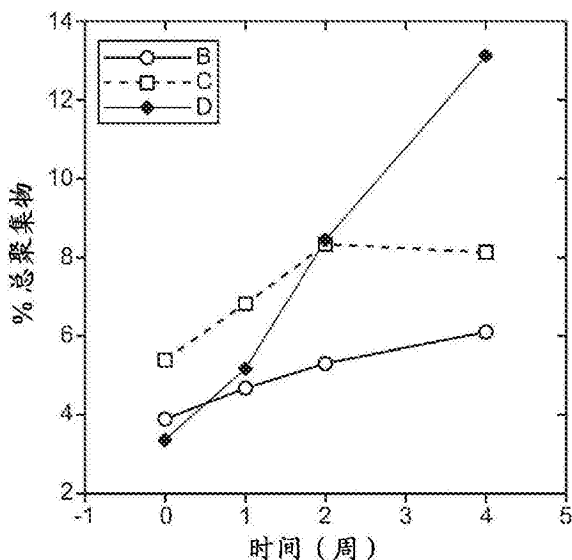
权利要求书1页 说明书50页 附图2页

(54)发明名称

抗体配制剂

(57)摘要

本发明涉及抗体配制剂。本发明提供一种稳定的含水药物配制剂,其包含治疗有效量的任选未进行在先冻干的抗体、维持pH在约4.0至约6.0的范围中的缓冲液、和任选的表面活性剂,制备此类配制剂的方法,及使用此类配制剂的方法。



1. 一种稳定的含水药物配制剂,该配制剂在pH 4.0至6.0的精氨酸缓冲液中包含治疗有效量的抗体。

2. 一种制品,其包含装有如下的稳定的含水药物配制剂的容器,该稳定的含水药物配制剂包含治疗有效量的抗体、约pH4.5至约6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液、和表面活性剂。

3. 一种用于在含水药物配制剂中稳定抗体的方法,其通过组合治疗有效量的抗体、约pH 4.5至约6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液、和表面活性剂来进行。

4. 一种稳定的含水药物配制剂,其包含治疗有效量的抗体、pH 5.2的200mM精氨酸乙酸盐缓冲液、表面活性剂。

5. 一种制品,其包含装有权利要求4的配制剂的容器。

6. 一种在受试者中治疗疾病或病症的方法,包括以有效治疗该疾病或病症的量对受试者施用权利要求1的配制剂。

7. 一种药物配制剂,其包含:(a)量为约10mg/mL至约250mg/mL的对脱酰胺或聚集易感的全长IgG1抗体;(b) pH 4.5至6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液;和(c)量为约0.01%至约0.1%的聚山梨酯20。

8. 一种用于降低治疗性单克隆抗体聚集的方法,包括在pH 4.5至6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液中配制该抗体。

9. 一种药物配制剂,其在pH约4.5至约6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液中包含结合VEGF的抗体和表面活性剂。

10. 一种制备药物配制剂的方法,包括:

(a) 制备权利要求1的配制剂;并

(b) 评估在该配制剂中该抗体的物理稳定性、化学稳定性、或生物学稳定性。

抗体配制剂

[0001] 本申请是申请日为2010年12月20日、中国申请号为201080064451.1、发明名称为“抗体配制剂”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2009年12月21日提交的美国临时专利申请号61/288,535的权益,在此通过述及完整收录其公开内容用于所有目的。

发明领域

[0004] 本发明致力于包含抗体的稳定的含水药物配制剂(aqueous pharmaceutical formulation)。

[0005] 发明背景

[0006] 在过去几年里,生物技术的进步使之可能使用重组DNA技术来生产多种蛋白质,供药物应用。因为蛋白质比传统的有机和无机药物更大且更复杂(例如在复杂的三维机构之外还拥有多种官能团),所以此类蛋白质的配制剂提出了特殊问题。为了使蛋白质维持生物学活性,配制剂必须至少使蛋白质氨基酸的核心序列的构象完整性保持完整,同时保护蛋白质的多种官能团免于降解。蛋白质的降解途径可涉及化学不稳定性(例如任何涉及通过键形成或切割来修饰蛋白质,产生新化学实体的过程)或物理不稳定性(例如蛋白质的高级结构的变化)。化学不稳定性可源自脱酰胺、外消旋、水解、氧化、 β 消除或二硫化物交换。物理不稳定性可源自例如变性、聚集、沉淀或吸附。三种最常见的蛋白质降解途径为蛋白质聚集、脱酰胺(deamidation)和氧化。Cleland et al Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4):307-377(1993)。

[0007] 用于药物应用的蛋白质包括抗体。对治疗有用的抗体的一个例子为结合VEGF的抗体。本领域需要适合治疗用途的包含抗体(诸如抗VEGF抗体)的稳定的含水药物配制剂。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供稳定的含水药物配制剂,其包含治疗有效量的任选未进行在先冻干的抗体、维持pH在约4.0至约6.0的范围中的缓冲液、和任选的表面活性剂,生成该配制剂的方法和使用该配制剂的方法。

[0010] 本发明的一个实施方案提供稳定的含水药物配制剂,该配制剂在pH 4.0至6.0的精氨酸缓冲液中含有治疗有效量的抗体。在一些实施方案中,缓冲液为pH 4.5至5.5的精氨酸乙酸盐缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液为pH 4.8至5.4的精氨酸乙酸盐缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液为pH 5.2的精氨酸乙酸盐缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约25mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约50mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约75mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约100mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约120mM至约240mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约150mM至约225mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约200mM。在一些实施方案中,配制剂进一步包含表面活性剂。在一些实施方案中,表面活

性剂为聚山梨酯。在一些实施方案中,聚山梨酯为聚山梨酯20。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.0001%至约1.0%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为约0.01%至约0.05%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.04%。在一些实施方案中,抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至200mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约30mg/ml至175mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至约100mg/ml。在一些实施方案中,抗体未进行在先冻干。在一些实施方案中,抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为全长抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为IgG1抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为人源化抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为包含抗原结合区的抗体片段。在一些实施方案中,抗体片段为Fab或F(ab')₂片段。在一些实施方案中,单克隆抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为贝伐单抗 (bevacizumab)。在一些实施方案中,单克隆抗体对聚集易感。在一些实施方案中,缓冲液为pH 5.2的200mM精氨酸乙酸盐,表面活性剂为量为约0.01-0.1%v/v的聚山梨酯且配制剂于约40°C的温度稳定至少28天。在一些实施方案中,配制剂是无菌的。在一些实施方案中,配制剂于约40°C保存至少28天时是稳定的。在一些实施方案中,配制剂含水且对受试者施用。在一些实施方案中,配制剂用于静脉内(IV)、皮下(SQ)或肌肉内(IM)施用。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。

[0011] 本发明的另一个实施方案提供制品,其包含装有稳定的含水药物配制剂的容器,该稳定的含水药物配制剂包含治疗有效量的抗体、约pH4.5至约6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液、和表面活性剂。在一些实施方案中,抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至200mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约30mg/ml至175mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至约100mg/ml。在一些实施方案中,抗体未进行在先冻干。在一些实施方案中,抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为全长抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为IgG1抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为人源化抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为包含抗原结合区的抗体片段。在一些实施方案中,抗体片段为Fab或F(ab')₂片段。在一些实施方案中,单克隆抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为贝伐单抗。在一些实施方案中,单克隆抗体对聚集易感。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙

酸盐浓度为约25mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约50mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约75mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约100mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约120mM至约240mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约150mM至约225mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约200mM。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.5至约5.5的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.8至约5.4的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约5.2的pH。在一些实施方案中,表面活性剂为聚山梨酯。在一些实施方案中,聚山梨酯为聚山梨酯20。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.0001%至约1.0%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为约0.01%至约0.05%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.04%。在一些实施方案中,配制剂是无菌的。在一些实施方案中,配制剂于约40°C保存至少28天时是稳定的。在一些实施方案中,配制剂含水且对受试者施用。在一些实施方案中,配制剂用于静脉内(IV)、皮下(SQ)或肌肉内(IM)施用。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。

[0012] 本发明的又一个实施方案提供在含水药物配制剂中稳定抗体的方法,其通过组合治疗有效量的抗体、约pH 4.5至约6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液、和表面活性剂来进行。在一些实施方案中,抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至200mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约30mg/ml至175mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至约100mg/ml。在一些实施方案中,抗体未进行在先冻干。在一些实施方案中,抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为全长抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为IgG1抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为人源化抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为包含抗原结合区的抗体片段。在一些实施方案中,抗体片段为Fab或F(ab')₂片段。在一些实施方案中,单克隆抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为贝伐单抗。在一些实施方案中,单克隆抗体对聚集易感。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约25mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约50mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约75mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约100mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐

浓度为约120mM至约240mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约150mM至约225mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约200mM。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.5至约5.5的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.8至约5.4的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约5.2的pH。在一些实施方案中,表面活性剂为聚山梨酯。在一些实施方案中,聚山梨酯为聚山梨酯20。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.0001%至约1.0%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为约0.01%至约0.05%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.04%。在一些实施方案中,配制剂是无菌的。在一些实施方案中,配制剂于40℃保存至少28天时是稳定的。在一些实施方案中,配制剂含水且对受试者施用。在一些实施方案中,配制剂用于静脉内(IV)、皮下(SQ)或肌肉内(IM)施用。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。

[0013] 本发明的又一个实施方案提供稳定的含水药物配制剂,其包含治疗有效量的抗体、pH 5.2的200mM精氨酸乙酸盐缓冲液、和表面活性剂。在一些实施方案中,抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至200mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约30mg/ml至175mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至约100mg/ml。在一些实施方案中,抗体未进行在先冻干。在一些实施方案中,抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为全长抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为IgG1抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为人源化抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为包含抗原结合区的抗体片段。在一些实施方案中,抗体片段为Fab或F(ab')₂片段。在一些实施方案中,单克隆抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为贝伐单抗。在一些实施方案中,单克隆抗体对聚集易感。在一些实施方案中,表面活性剂为聚山梨酯。在一些实施方案中,聚山梨酯为聚山梨酯20。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.0001%至约1.0%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为约0.01%至约0.05%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.04%。在一些实施方案中,配制剂是无菌的。在一些实施方案中,配制剂于约40℃保存至少28天时是稳定的。在一些实施方案中,配制剂含水且对受试者施用。在一些实施方案中,配制剂用于静脉内(IV)、皮下(SQ)或肌肉内(IM)施用。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些

实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。

[0014] 本发明的又一个实施方案提供药物配制剂,其包含:(a)量为约10mg/mL至约250mg/mL的对脱酰胺或聚集易感的全长IgG1抗体;(b)pH 4.5至6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液;和(c)量为约0.01%至约0.1%的聚山梨酯20。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至200mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约30mg/ml至175mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至约100mg/ml。在一些实施方案中,抗体未进行在先冻干。在一些实施方案中,抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为贝伐单抗。在一些实施方案中,抗体为人源化抗体。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约25mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约50mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约75mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约100mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约120mM至约240mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约150mM至约225mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约200mM。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.5至约5.5的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.8至约5.4的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约5.2的pH。在一些实施方案中,聚山梨酯20为约0.01%至约0.05%。在一些实施方案中,聚山梨酯20为0.04%。在一些实施方案中,配制剂是无菌的。在一些实施方案中,配制剂于约40℃保存至少28天时是稳定的。在一些实施方案中,配制剂含水且对受试者施用。在一些实施方案中,配制剂用于静脉内(IV)、皮下(SQ)或肌肉内(IM)施用。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。

[0015] 本发明的又一个实施方案提供药物配制剂,其在pH约4.5至约6.0的精氨酸乙酸盐

盐缓冲液中包含结合VEGF的抗体,和表面活性剂。在一些实施方案中,抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至200mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约30mg/ml至175mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至约100mg/ml。在一些实施方案中,抗体未进行在先冻干。在一些实施方案中,抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为全长抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为IgG1抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为人源化抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为包含抗原结合区的抗体片段。在一些实施方案中,抗体片段为Fab或F(ab')₂片段。在一些实施方案中,抗体为贝伐单抗。在一些实施方案中,单克隆抗体对聚集易感。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约25mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约50mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约75mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约120mM至约240mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约150mM至约225mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约200mM。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.5至约5.5的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.8至约5.4的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约5.2的pH。在一些实施方案中,表面活性剂为聚山梨酯。在一些实施方案中,聚山梨酯为聚山梨酯20。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.0001%至约1.0%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为约0.01%至约0.05%。在一些实施方案中,表面活性剂浓度为0.04%。在一些实施方案中,配制剂是无菌的。在一些实施方案中,配制剂于约40°C保存至少28天时是稳定的。在一些实施方案中,配制剂含水且对受试者施用。在一些实施方案中,配制剂用于静脉内(IV)、皮下(SQ)或肌肉内(IM)施用。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。

[0016] 本发明的另一个实施方案提供降低治疗性单克隆抗体聚集的方法,包括在pH 4.5至6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液中配制该抗体。在一些实施方案中,抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至200mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约30mg/ml至175mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度为约25mg/ml至约100mg/ml。在一些实施方案中,抗体未进行在先冻干。在一些实施方案中,抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为全长抗体。在一些实施方案中,单克隆

抗体为IgG1抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为人源化抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体为包含抗原结合区的抗体片段。在一些实施方案中,抗体片段为Fab或F(ab')₂片段。在一些实施方案中,单克隆抗体结合VEGF。在一些实施方案中,抗体为贝伐单抗。在一些实施方案中,单克隆抗体对聚集易感。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约25mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约50mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约75mM至约250mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约120mM至约240mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约150mM至约225mM。在一些实施方案中,缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约200mM。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.5至约5.5的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约4.8至约5.4的pH。在一些实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液具有约5.2的pH。在一些实施方案中,配制剂是无菌的。在一些实施方案中,配制剂于约40℃保存至少28天时是稳定的。在一些实施方案中,配制剂含水且对受试者施用。在一些实施方案中,配制剂用于静脉内(IV)、皮下(SQ)或肌肉内(IM)施用。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IV施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约25mg/ml至约175mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于SQ施用且抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。在一些实施方案中,配制剂用于IM施用且抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。

[0017] 本发明的甚至又一个实施方案提供制品,其包含装有本文所述任一配制剂的容器。

[0018] 本发明的还有又一个实施方案提供带注射器可刺穿的塞子的管形瓶,其装有本文所述任一配制剂。在一些实施方案中,管形瓶保存于约2-8℃。在一些实施方案中,管形瓶为3cc、20cc或50cc管形瓶。

[0019] 本发明的另一个实施方案提供不锈钢罐,其在该罐内部装有本文所述任一配制剂。在一些实施方案中,配制剂是无菌的。

[0020] 本发明的又一个实施方案提供制备药物配制剂的方法,包括:(a)制备本文所述任一配制剂;并(b)评估在该配制剂中该抗体的物理稳定性、化学稳定性、或生物学稳定性。

[0021] 本发明的还有另一个实施方案提供在受试者中治疗疾病或病症的方法,包括以有效治疗该疾病或病症的量对受试者施用本文所述任一配制剂。在一些实施方案中,疾病为癌症。在一些实施方案中,癌症选自结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌、和成胶质细胞瘤。

[0022] 本发明涉及下述实施方案。

[0023] 1.一种稳定的含水药物配制剂,该配制剂在pH 4.0至6.0的精氨酸缓冲液中包含治疗有效量的抗体。

- [0024] 2. 实施方案1的配制剂,其中该缓冲液为pH 4.5至5.5的精氨酸乙酸盐缓冲液。
- [0025] 3. 实施方案1的配制剂,其中该缓冲液为pH 4.8至5.4的精氨酸乙酸盐缓冲液。
- [0026] 4. 实施方案1的配制剂,其中该缓冲液为pH 5.2的精氨酸乙酸盐缓冲液。
- [0027] 5. 实施方案2、3、或4的配制剂,其中该缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约25mM至约250mM。
- [0028] 6. 实施方案2、3、或4的配制剂,其中该缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约50mM至约250mM。
- [0029] 7. 实施方案2、3、或4的配制剂,其中该缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约75mM至约250mM。
- [0030] 8. 实施方案2、3、或4的配制剂,其中该缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约100mM至约250mM。
- [0031] 9. 实施方案2、3、或4的配制剂,其中该缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约120mM至约240mM。
- [0032] 10. 实施方案2、3、或4的配制剂,其中该缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约150mM至约225mM。
- [0033] 11. 实施方案2、3、或4的配制剂,其中该缓冲液中的精氨酸乙酸盐浓度为约200mM。
- [0034] 12. 实施方案1的配制剂,其进一步包含表面活性剂。
- [0035] 13. 实施方案12的配制剂,其中该表面活性剂为聚山梨酯。
- [0036] 14. 实施方案13的配制剂,其中该聚山梨酯为聚山梨酯20。
- [0037] 15. 实施方案12的配制剂,其中该表面活性剂浓度为0.0001%至约1.0%。
- [0038] 16. 实施方案12的配制剂,其中该表面活性剂浓度为约0.01%至约0.05%。
- [0039] 17. 实施方案12的配制剂,其中该表面活性剂浓度为0.04%。
- [0040] 18. 实施方案1的配制剂,其中该抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。
- [0041] 19. 实施方案1的配制剂,其中该抗体浓度为约25mg/ml至200mg/ml。
- [0042] 20. 实施方案1的配制剂,其中该抗体浓度为约50mg/ml至约150mg/ml。
- [0043] 21. 实施方案1的配制剂,其中该抗体浓度为约75mg/ml至约125mg/ml。
- [0044] 22. 实施方案1的配制剂,其中该抗体未进行在先冻干。
- [0045] 23. 实施方案1的配制剂,其中该抗体结合VEGF。
- [0046] 24. 实施方案1的配制剂,其中该抗体为单克隆抗体。
- [0047] 25. 实施方案24的配制剂,其中该单克隆抗体为全长抗体。
- [0048] 26. 实施方案24的配制剂,其中该单克隆抗体为IgG1抗体。
- [0049] 27. 实施方案24的配制剂,其中该单克隆抗体为人源化抗体。
- [0050] 28. 实施方案24的配制剂,其中该单克隆抗体为包含抗原结合区的抗体片段。
- [0051] 29. 实施方案28的配制剂,其中该抗体片段为Fab或F(ab')₂片段。
- [0052] 30. 实施方案24的配制剂,其中该单克隆抗体结合VEGF。
- [0053] 31. 实施方案30的配制剂,其中该抗体为贝伐单抗 (bevacizumab)。
- [0054] 32. 实施方案1的配制剂,其中该单克隆抗体对聚集易感。
- [0055] 33. 实施方案2的配制剂,其中该缓冲液为pH 5.2的200mM精氨酸乙酸盐,该表面活性剂为量为约0.01-0.1%v/v的聚山梨酯,其中该配制剂在约40℃的温度稳定至少28天。

- [0056] 34.一种制品,其包含装有如下的稳定的含水药物配制剂的容器,该稳定的含水药物配制剂包含治疗有效量的抗体、约pH4.5至约6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液、和表面活性剂。
- [0057] 35.实施方案34的制品,其中该抗体结合VEGF。
- [0058] 36.实施方案35的制品,其中该抗体为贝伐单抗。
- [0059] 37.一种用于在含水药物配制剂中稳定抗体的方法,其通过组合治疗有效量的抗体、约pH 4.5至约6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液、和表面活性剂来进行。
- [0060] 38.实施方案37的方法,其中该抗体结合VEGF。
- [0061] 39.实施方案38的方法,其中该抗体为贝伐单抗。
- [0062] 40.一种稳定的含水药物配制剂,其包含治疗有效量的抗体、pH 5.2的200mM精氨酸乙酸盐缓冲液、表面活性剂。
- [0063] 41.实施方案40的配制剂,其中该抗体结合VEGF。
- [0064] 42.实施方案41的配制剂,其中该抗体为贝伐单抗。
- [0065] 43.一种制品,其包含装有实施方案40-42任一项的配制剂的容器。
- [0066] 44.实施方案1的配制剂,其是无菌的。
- [0067] 45.实施方案1的配制剂,其于约40°C保存至少28天时是稳定的。
- [0068] 46.实施方案1的配制剂,其是水性配制剂,且对受试者施用。
- [0069] 47.实施方案46的配制剂,其中该配制剂用于静脉内 (IV)、皮下 (SQ) 或肌肉内 (IM) 施用。
- [0070] 48.实施方案46的配制剂,其用于IV施用且该抗体浓度为约10mg/ml至约250mg/ml。
- [0071] 49.实施方案46的配制剂,其用于IV施用且该抗体浓度为约50mg/ml至约100mg/ml。
- [0072] 50.实施方案46的配制剂,其用于SQ施用且该抗体浓度为约25mg/ml至约250mg/ml。
- [0073] 51.实施方案46的配制剂,其用于SQ施用且该抗体浓度为约50mg/ml至约100mg/ml。
- [0074] 52.一种带注射器可刺穿的塞子的管形瓶,在该管形瓶内部装有实施方案1的配制剂。
- [0075] 53.实施方案52的管形瓶,其保存于约2-8°C。
- [0076] 54.实施方案52的管形瓶,其为3cc、20cc或50cc管形瓶。
- [0077] 55.一种不锈钢罐,在该罐内部装有实施方案1的配制剂。
- [0078] 56.实施方案55的罐,其中该配制剂是无菌的。
- [0079] 57.一种在受试者中治疗疾病或病症的方法,包括以有效治疗该疾病或病症的量对受试者施用实施方案1的配制剂。
- [0080] 58.实施方案57的方法,其中该抗体结合VEGF。
- [0081] 59.实施方案58的方法,其中该抗体为贝伐单抗。
- [0082] 60.一种药物配制剂,其包含:(a)量为约10mg/mL至约250mg/mL的对脱酰胺或聚集易感的全长IgG1抗体;(b) pH 4.5至6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液;和(c)量为约0.01%至约0.1%的聚山梨酯20。

- [0083] 61. 实施方案60的配制剂,其中该抗体结合VEGF。
- [0084] 62. 实施方案61的配制剂,其中该抗体为贝伐单抗。
- [0085] 63. 一种用于降低治疗性单克隆抗体聚集的方法,包括在pH 4.5至6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液中配制该抗体。
- [0086] 64. 实施方案63的方法,其中该抗体结合VEGF。
- [0087] 65. 实施方案64的方法,其中该抗体为贝伐单抗。
- [0088] 66. 一种药物配制剂,其在pH约4.5至约6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液中包含结合VEGF的抗体和表面活性剂。
- [0089] 67. 实施方案66的配制剂,其中该抗体为贝伐单抗。
- [0090] 68. 一种制备药物配制剂的方法,包括:
- [0091] (a) 制备实施方案1的配制剂;并
- [0092] (b) 评估在该配制剂中该抗体的物理稳定性、化学稳定性、或生物学稳定性。
- [0093] 69. 实施方案68的方法,其中该抗体结合VEGF。
- [0094] 70. 实施方案69的方法,其中该抗体为贝伐单抗。
- [0095] 通过下面的详述进一步描述本发明的这些和其它方面。
- [0096] 附图简述
- [0097] 图1图示在于40℃保存长达4周的抗VEGF配制剂(100mg/ml)中检测到的总聚集物水平。
- [0098] 图2图示在抗VEGF配制剂(0、50、100、和150mg/ml)中检测到的总聚集物水平。
- [0099] 图3图示在抗VEGF配制剂(100mg/ml)中检测到的二聚体水平,与于40℃保存长达4周比较。
- [0100] 图4图示抗VEGF配制剂在20℃的粘度,作为抗VEGF浓度(25、50、100、125、150、或175mg/ml)的函数。
- [0101] 发明详述
- [0102] I. 定义
- [0103] 在详细描述本发明之前,应当理解本发明不限于特定组合物或生物学系统,它们当然可以有所变化。还应理解本文中所使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并非意图对其进行限制。如本说明书和所附权利要求中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数所指物,除非另有明确说明。如此,例如,提及“一个/种分子”任选包括两个/种或更多个/种此类分子的组合,诸如此类。
- [0104] 术语“药物配制剂”指如下形式的制备物,使得容许活性组分的生物学活性有效,且不含别的会对施用配制剂的受试者有不可接受的毒性的成分。此类配制剂是无菌的。“药学可接受”赋形剂(媒介、添加剂)为那些可合理施用于受试哺乳动物以提供有效剂量的所采用的活性组分。
- [0105] “无菌”配制剂没有活菌或者没有或基本上没有所有活的微生物及其孢子。
- [0106] 在本文中,“冷冻”配制剂为一种处于0℃以下的温度的。一般地,冷冻配制剂不是冷冻干燥的,也未进行在先或后续冻干。在某些实施方案中,冷冻配制剂包含供贮藏的冷冻药物物质(在不锈钢罐中)或冷冻药物产品(在最终管形瓶构造中)。
- [0107] “稳定”配制剂为一种其中的蛋白质在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学

稳定性和/或生物学活性的。优选地,配制剂在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性,以及其生物学活性。贮藏期一般基于配制剂的预定架存期来选择。多种用于测量蛋白质稳定性的分析技术是本领域可得的且综述于例如Peptide and Protein Drug Delivery,247-301,Vincent Lee Ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,Pubs.(1991)及Jones,A.Adv Drug Delivery Rev.10:29-90(1993)。可测量在预定温度贮藏预定时间段后的稳定性。在某些实施方案中,配制剂于约40°C稳定至少约1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、或更多天。在某些实施方案中,配制剂于约40°C稳定至少约1、2、3、4、5、6、7、8、或更多周。在某些实施方案中,配制剂于约25°C稳定至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或更多个月。在某些实施方案中,配制剂于约5°C稳定至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或更多个月。在某些实施方案中,配制剂于约-20°C稳定至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、或更多个月。在某些实施方案中,配制剂于5°C或-20°C稳定至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、或更多个月。另外,配制剂优选在冷冻(至例如-20°C或-70°C)和融化配制剂后(例如在1、2、3、4或5个循环的冷冻和融化后)稳定。可以多种不同方式定性和/或定量评估稳定性,包括评估聚集(例如使用大小排阻层析、通过测量浊度、和/或通过视觉检查);使用阳离子交换层析、图像毛细管等电聚焦(icIEF)或毛细管区带电泳评估电荷异质性;氨基末端或羧基末端序列分析;质谱分析;SDS-PAGE分析以比较还原型(reduced)和完整抗体;肽图(例如胰蛋白酶或LYS-C)分析;评估抗体的生物学活性或抗原结合功能;等。不稳定性可涉及下述一项或多项:聚集,脱酰胺(例如Asn脱酰胺),氧化(例如Met氧化),异构化(例如Asp异构化),修剪/水解/片段化(例如铰链区片段化),琥珀酰亚胺形成,不配对的半胱氨酸,N端延伸,C端加工,糖基化差异,等。

[0108] 若在视觉检查颜色和/或澄清度时,或根据UV光散射或大小排阻层析的测量,蛋白质显示很少的聚集、沉淀和/或变性或没有上述迹象的话,则它在药物配制剂中“保留其物理稳定性”。

[0109] 若在给定时间的化学稳定性使得蛋白质被认定为仍然保留其生物学活性,如下文定义的,则蛋白质在药物配制剂中“保留其化学稳定性”。化学稳定性可通过检测和定量蛋白质的化学改变形式来评估。化学改变可涉及大小修饰(例如修剪),这可使用例如大小排阻层析、SDS-PAGE和/或基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱术(MALDI/TOF MS)来评估。其它类型的化学改变包括电荷改变(例如因脱酰胺而发生的),其可通过例如离子交换层析或icIEF来评估。

[0110] 若抗体在给定时间的生物学活性在制备药物配制剂时的生物学活性的约10%之内(在测定法的误差之内),如在例如抗原结合测定法中测定的,则抗体在药物配制剂中“保留其生物学活性”。本文中下文详述了用于抗体的其它“生物学活性”测定法。

[0111] 在本文中,单克隆抗体的“生物学活性”指抗体结合抗原的能力。它可进一步包括抗体结合抗原并导致可测量的生物学应答,其可在体外或在体内测量。此类活性可以是拮抗性的或激动性的。

[0112] “脱酰胺”单克隆抗体在本文中为它的一个或多个天冬酰胺残基已被衍生物成例

如天冬氨酸或异天冬氨酸的单克隆抗体。

[0113] “对脱酰胺易感的”抗体为包含一个或多个发现倾向于脱酰胺的残基的抗体。

[0114] “对聚集易感的”抗体为发现与其它抗体分子聚集(尤其在冷冻和/或搅动时)的抗体。

[0115] “对片段化易感的”抗体为发现被切割成两个或更多个片段(例如在其较链区处)的抗体。

[0116] “降低脱酰胺、聚集、或片段化”意图相当于在不同pH或在不同缓冲液中配制的单克隆抗体,阻止或降低脱酰胺、聚集、或片段化的量。

[0117] 配制的抗体优选基本上纯的且希望基本上同质的(例如没有污染性蛋白质等)。“基本上纯的”抗体表示基于组合物的总重量,组合物包含以重量计至少约90%、优选以重量计至少约95%的抗体。“基本上同质的”抗体表示基于组合物的总重量,组合物包含以重量计至少约99%的抗体。

[0118] “等张”表示感兴趣的配制剂与人血液具有基本上相同的渗透压。等张配制剂一般会具有约250至350mOsm的渗透压。等张性可使用例如蒸气压或冰冻型渗透压计来测量。

[0119] 如本文中使用的,“缓冲液”指通过其酸-碱配合成分的作用来抵抗pH变化的缓冲溶液。本发明的缓冲液优选具有在约4.5至约7.0,优选约4.5至约6.5,例如约4.5至6.0、4.5至5.9、4.5至5.8、4.5至5.7、4.5至5.6、4.5至5.5、4.5至5.6、4.5至5.5、4.5至5.4、4.5至5.3、4.5至5.2、4.5至5.1、4.5至5.0、4.5至4.9、4.5至4.8、4.5至4.7、或4.5至4.6的范围中的pH。在一个实施方案中,缓冲液具有pH 4.5、4.6、4.7、4.8、4.8、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、或6.0。会控制pH在此范围中的缓冲液的例子包括乙酸盐、琥珀酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲液。

[0120] “精氨酸缓冲液”为包含精氨酸离子的缓冲液。精氨酸缓冲液的例子包括精氨酸乙酸盐、精氨酸氯化物、精氨酸磷酸盐、精氨酸硫酸盐、精氨酸琥珀酸盐、等。在一个实施方案中,精氨酸缓冲液是精氨酸乙酸盐。在一个实施方案中,精氨酸乙酸盐缓冲液通过用乙酸(液体)滴定L-精氨酸(游离碱,固体)来制备。在某些实施方案中,精氨酸缓冲液处于pH 4.5至6.0、4.5至5.9、4.5至5.8、4.5至5.7、4.5至5.6、4.5至5.5、4.5至5.6、4.5至5.5、4.5至5.4、4.5至5.3、4.5至5.2、4.5至5.1、4.5至5.0、4.5至4.9、4.5至4.8、4.5至4.7、或4.5至4.6。在一个实施方案中,缓冲液具有pH 4.5、4.6、4.7、4.8、4.8、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、或6.0。

[0121] 在本文中,“表面活性剂”指表面活性作用剂,优选非离子型表面活性剂。本文中的表面活性剂的例子包括聚山梨酯(例如聚山梨酯20和聚山梨酯80);Poloxamer(例如Poloxamer 188);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-、或硬脂酰基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-、或硬脂酰基-肌氨酸;亚油基-、肉豆蔻基-、或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰氨基丙基-、椰油酰氨基丙基-、亚油酰氨基丙基-、肉豆蔻酰氨基丙基-、棕榈酰氨基丙基-、或异硬脂酰氨基丙基-甜菜碱(例如月桂酰氨基丙基);肉豆蔻酰氨基丙基-、棕榈酰氨基丙基-、或异硬脂酰氨基丙基-二甲胺;甲基椰油基牛磺酸钠或甲基油基牛磺酸二钠;和MONAQUAT™系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.);聚乙二醇、聚丙二醇、及乙二醇和丙二醇共聚物(例如Pluronic、PF68等);等。在一个实施方案中,本文中的表面活性剂为聚山梨酯20。

[0122] 在药理学意义上,在本发明的语境中,抗体的“治疗有效量”指有效预防或治疗抗体可有效治疗的病症的量。“病症”为会受益于抗体处理的任何状况。这包括慢性和急性病症或疾病,包括那些使哺乳动物易患所讨论病症的病理状况。

[0123] “防腐剂”为如下的化合物,其可任选地包括在配制剂中以本质上降低其中的细菌作用,如此便于生产例如多次使用配制剂。潜在防腐剂的例子包括十八烷基二甲基苯甲基氯化铵、氯己双胺、苯扎氯铵(烃基苯甲基二甲基氯化铵的混合物,其中烃基是长链化合物)、和苜索氯铵。其它类型的防腐剂包括芳香醇诸如酚、丁醇和苯甲醇,烃基对羟基苯甲酸酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯,邻苯二酚,间苯二酚,环己醇,3-戊醇,和间甲酚。在一个实施方案中,本文中的防腐剂为苯甲醇。

[0124] “多元醇”为具有多个羟基的物质,而且包括糖(还原和非还原糖)、糖醇和糖酸。多元醇可任选地包括在配制剂中。在某些实施方案中,本文中的多元醇具有小于约600kD的分子量(例如在约120至约400kD的范围中)。“还原糖”为含有能还原金属离子或与蛋白质中的赖氨酸和其它氨基共价反应的半缩醛基团的糖,而“非含有糖”为不具有还原糖的这些特性的糖。还原糖的例子有果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖和葡萄糖。非还原糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖和棉子糖。甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、苏糖醇、山梨醇和甘油是糖醇的例子。至于糖酸,这些包括L-葡萄糖酸及其金属盐。在期望配制剂为冻融稳定的情况中,多元醇优选为在冷冻温度(例如-20°C)不结晶的多元醇,使得它使配制剂中的抗体失稳。在某些实施方案中,非还原糖诸如蔗糖和海藻糖是多元醇的例子,由于海藻糖的溶液稳定性,优选海藻糖胜过蔗糖。

[0125] 如本文中使用的,术语“VEGF”或“VEGF-A”指165个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子及相关的121个、189个和206个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子,如Leung et al. (1989) *Science* 246:1306;及Houck et al. (1991) *Mol. Endocrin.* 5:1806所述,及其天然存在等位基因形式和加工形式。术语“VEGF”还指来自非人物种诸如小鼠、大鼠或灵长类动物的VEGF。有时,来自特定物种的VEGF表示如下,hVEGF表示人VEGF,mVEGF表示小鼠VEGF,等等。术语“VEGF”还用于指包含165个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子的氨基酸第8-109位或第1-109位的截短形式多肽。本申请中可能通过例如“VEGF(8-109)”、“VEGF(1-109)”或“VEGF₁₆₅”来鉴别任何此类形式VEGF。“截短的”天然VEGF的氨基酸位置如天然VEGF序列中所示编号。例如,截短的天然VEGF中的第17位氨基酸(甲硫氨酸)也是天然VEGF中的第17位(甲硫氨酸)。截短的天然VEGF具有与天然VEGF相当的对KDR和Flt-1受体的结合亲和力。

[0126] “VEGF生物学活性”包括对任何VEGF受体的结合或任何VEGF信号传导活性,调节诸如对正常的和异常的血管发生(angiogenesis)和脉管发生(vasculogenesis) (Ferrara和Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543);促进胚胎脉管发生和血管发生(Carmeliet et al. (1996) *Nature* 380:435-439; Ferrara et al. (1996) *Nature* 380:439-442);及调控雌性生殖道中的和为了骨生长和软骨形成的周期性血管增殖(Ferrara et al. (1998) *Nature Med.* 4:336-340; Gerber et al. (1999) *Nature Med.* 5:623-628)。在作为血管发生和脉管发生中的血管发生因子之外,VEGF,作为多效生长因子,在生理过程诸如内皮细胞存活、血管通透性和血管舒张、单核细胞趋化性和钙内流中展现出多种生物学效应(Ferrara和Davis-Smyth (1997), 见上文;及Cebe-Suarez et al. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:601-615 (2006))。此外,最近的研究报道了VEGF对少数非内皮

细胞类型诸如视网膜色素上皮细胞、胰导管细胞、和许旺 (Schwann) 细胞的促有丝分裂效应 (Guerrin et al. (1995) *J. Cell Physiol.* 164:385-394; Oberg-Welsh et al. (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132; Sondell et al. (1999) *J. Neurosci.* 19:5731-5740)。

[0127] “VEGF拮抗剂”或“VEGF特异性拮抗剂”指能够结合VEGF,降低VEGF表达水平,或者中和、阻断、抑制、消除、降低或干扰VEGF生物学活性(包括但不限于VEGF与一种或多种VEGF受体的结合及由VEGF介导的血管发生和内皮细胞存活或增殖)的分子。在本发明的方法中有用的VEGF特异性拮抗剂包括特异性结合VEGF的多肽、抗VEGF抗体及其抗原结合片段、特异性结合VEGF由此使其隔绝与一种或多种受体结合的受体分子和衍生物、融合蛋白(例如VEGF-Trap (Regeneron))、和VEGF₁₂₁-白树毒素 (Peregrine)。VEGF特异性拮抗剂还包括VEGF多肽的拮抗性变体、针对VEGF的反义核碱基寡聚物、针对VEGF的小RNA分子、RNA适体、肽体、和针对VEGF的核酶。VEGF特异性拮抗剂还包括结合VEGF且能够阻断、抑制、消除、降低、或干扰VEGF生物学活性的非肽小分子。如此,术语“VEGF活性”明确包括VEGF介导的VEGF生物学活性。在某些实施方案中,VEGF拮抗剂将VEGF的表达水平或生物学活性降低或抑制了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0128] “抗VEGF抗体”指以足够亲和力和特异性结合VEGF的抗体。在某些实施方案中,所选择的抗体通常会具有足够的对VEGF的结合亲和力,例如,该抗体可以以介于100nM-1pM之间的K_d值结合hVEGF。抗体亲和力可通过例如基于表面等离子共振的测定法(诸如PCT申请公开文本No. W02005/012359中所记载的BIAcore测定法);酶联免疫吸附测定法(ELISA);和竞争测定法(例如RIA)来测定。

[0129] 在某些实施方案中,抗VEGF抗体可用作治疗剂,用于靶向和干扰其中牵涉VEGF活性的疾病或疾患。还有,该抗体可进行其它生物学活性测定法,例如为了评估其作为治疗剂的效力。此类测定法是本领域已知的,而且取决于抗体的靶抗原和预定用途。例子包括HUVEC抑制测定法;肿瘤细胞生长抑制测定法(如例如W0 89/06692中所记载的);抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)和补体介导的细胞毒性(CDC)测定法(美国专利5,500,362);及激动活性或造血测定法(参见W0 95/27062)。抗VEGF抗体通常不会结合其它VEGF同系物,诸如VEGF-B或VEGF-C,也不会结合其它生长因子,诸如PlGF、PDGF或bFGF。在一个实施方案中,抗VEGF抗体是与杂交瘤ATCC HB 10709所生成的单克隆抗VEGF抗体A4.6.1结合相同表位的单克隆抗体。在另一个实施方案中,抗VEGF抗体是依照Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599生成的重组人源化抗VEGF单克隆抗体,包括但不限于称作贝伐单抗 (Bevacizumab, BV; **AVASTIN®**) 的抗体。

[0130] 抗VEGF抗体“贝伐单抗 (BV)”,也称作“rhuMAb VEGF”或“**AVASTIN®**”,是一种依照Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599生成的重组人源化抗VEGF单克隆抗体。它涵盖突变的人IgG1框架区和来自鼠抗hVEGF单克隆抗体A.4.6.1(其阻断人VEGF对其受体的结合)的抗原结合互补决定区。贝伐单抗大约93%的氨基酸序列,包括大部分框架区,衍生自人IgG1,而大约7%的序列衍生自小鼠抗体A4.6.1。贝伐单抗具有约149,000道尔顿的分子量,而且是糖基化的。贝伐单抗和其它人源化抗VEGF抗体进一步记载于2005年2月26日公告的美国专利No. 6,884,879,通过述及明确将其完整公开内容收入本文。

[0131] 如本文中使用的,术语“B20系列多肽”指包括结合VEGF的抗体的多肽。B20系列多肽包括但不限于自B20抗体的序列衍生的抗体或美国公开文本No. 20060280747,美国公开

文本No.20070141065和/或美国公开文本No.20070020267中记载的B20衍生抗体,通过述及明确将这些专利申请的内容收入本文。在一个实施方案中,B20系列多肽是美国公开文本No.20060280747,美国公开文本No.20070141065和/或美国公开文本No.20070020267中记载的B20-4.1。在另一个实施方案中,B20系列多肽是美国专利申请60/991,302中记载的B20-4.1.1,通过述及将其完整公开内容收入本文。

[0132] 如本文中使用的,术语“G6系列多肽”指包括结合VEGF的抗体的多肽。G6系列多肽包括但不限于自G6抗体的序列衍生的抗体或美国公开文本No.20060280747,美国公开文本No.20070141065和/或美国公开文本No.20070020267中记载的G6衍生抗体。美国公开文本No.20060280747,美国公开文本No.20070141065和/或美国公开文本No.20070020267中记载的G6系列多肽包括但不限于G6-8,G6-23和G6-31。

[0133] 对于别的抗体,参见美国专利No.7,060,269,6,582,959,6,703,020;6,054,297;W098/45332;W0 96/30046;W094/10202;EP 0666868B1;美国专利申请公开No.2006009360,20050186208,20030206899,20030190317,20030203409,和20050112126;及Popkov et al.,*Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004)。在某些实施方案中,其它抗体包括那些结合人VEGF上包含残基F17,M18,D19,Y21,Y25,Q89,I91,K101,E103,和C104或者包含残基F17,Y21,Q22,Y25,D63,I83和Q89的功能性表位的。

[0134] 还知道其它抗VEGF抗体,而且记载于例如Liang et al.,*J Biol Chem* 281,951-961 (2006)。

[0135] “治疗”指治疗性处理和预防性或防范性措施二者。需要治疗的受试者包括早就患有病症的受试者以及要预防病症的受试者。“病症”指将会从处理中获益的任何疾患,包括但不限于慢性和急性病症,或者包括那些使哺乳动物趋向于所讨论病症的病理状况的疾病。病症包括血管发生性病症。如本文中使用的,“血管发生性病症”指涉及异常血管发生或异常血管通透性或渗漏的任何疾患。本文中要治疗的血管发生性病症的非限制性例子包括恶性和良性肿瘤;非白血病和淋巴样恶性肿瘤;和特别是肿瘤(癌症)转移。

[0136] “异常血管发生”发生于病情中的或引起病情的新血管生长过度或其它方面不当(例如从医学观点看不良的血管发生位置、时机、程度、或启动)时。在一些情况中,过度的、失控的、或其它方面不当的血管发生发生于有促成病情恶化或引起病情的新血管生长时。新血管可供应患病组织,破坏正常组织,而且,在癌症的情况中,新血管可容许肿瘤细胞逃入循环并停留在其它器官中(肿瘤转移)。涉及异常血管发生的病症的例子包括但不限于癌症,尤其是血管化实体瘤和转移瘤(包括结肠癌、肺癌(尤其是小细胞肺癌、或前列腺癌),由眼部新血管形成引起的疾病尤其是糖尿病性失明、视网膜病变、原发性糖尿病性视网膜病变(primarily diabetic retinopathy)或老年性黄斑变性,脉络膜新血管形成(CNV),糖尿病黄斑水肿,病理性近视,von Hippel-Lindau病,眼部组织胞浆菌病,视网膜中央静脉阻塞(CRVO),角膜新血管形成,视网膜新血管形成和发红;银屑病、银屑病关节炎、成血管细胞瘤诸如血管瘤;炎性肾病,诸如肾小球肾炎,尤其是膜增生性肾小球肾炎、溶血性尿毒综合征(haemolytic uremic syndrome)、糖尿病肾病或高血压肾硬化;各种炎性疾病,诸如关节炎,尤其是类风湿性关节炎、炎性肠病、银屑病、结节病、动脉硬化和移植后发生的疾病、子宫内膜异位症或慢性哮喘,及其它疾患。

[0137] “异常血管通透性”发生于疾病状态中的或引起疾病状态的血管与血管外区室之

间的流体、分子(例如离子和营养物)和细胞(例如淋巴细胞)的流动过度或其它方面不当(例如从医学观点看不良的血管通透性位置、时间、程度、或启动)时。异常血管通透性可导致过度的或其它方面不当的离子、水、营养物、或细胞经由血管系统“渗漏”。在有些情况中,过度的、失控的、或其它方面不当的血管通透性或血管渗漏加剧或诱发疾病状态,包括例如与肿瘤(包括脑瘤)有关的水肿;与恶性肿瘤有关的腹水;梅格斯氏(Meigs)综合征;肺部炎症;肾病综合征;心包积液;胸腔积液;与心血管疾病(诸如心肌梗死和中风后的疾患)有关的通透性等等。本发明涵盖治疗那些形成或有风险形成与异常血管通透性或渗漏有关的疾病和病症的患者。

[0138] 术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症指癌症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症是肿瘤。

[0139] “肿瘤”在用于本文时指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性病症”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。

[0140] 术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌,淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括但不限于鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤、浅表扩散性黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、肢端黑素瘤、结节性黑素瘤、多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级成免疫细胞性NHL、高级成淋巴细胞性NHL、高级小无核裂细胞性NHL、贮积病(bulky disease)NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤、和瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom)巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、和移植后淋巴增殖性病症(PTLD)、以及与癍痣病(phakomatoses)、水肿(诸如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖、脑瘤和脑癌、以及头颈癌、及相关转移。在某些实施方案中,适合于通过本发明的抗体来治疗的癌症包括乳腺癌、结肠直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、成胶质细胞瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西(Kaposi)氏肉瘤、类癌(carcinoid carcinoma)、头颈癌、卵巢癌、间皮瘤、和多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,癌症选自:小细胞肺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌(CRC)、和肝细胞癌。还有,在一些实施方案中,癌症选自:非小细胞肺癌、结肠直肠癌、成胶质细胞瘤和乳腺癌,包括那些癌症的转移性形式。

[0141] 术语“抗癌疗法”指在治疗癌症中有用的疗法。抗癌治疗剂的例子包括但不限于例如化疗剂、生长抑制剂、细胞毒剂、放射疗法中所使用的药剂、抗血管发生剂、凋亡剂、抗微管蛋白剂、和其它治疗癌症的药剂,诸如抗HER-2抗体、抗CD20抗体、表皮生长因子受体(EGFR)拮抗剂(例如酪氨酸激酶抑制剂)、HER1/EGFR抑制剂(例如erlotinib (Tarceva™))、

血小板衍生生长因子抑制剂(例如Gleevec™(Imatinib Mesylate))、COX-2抑制剂(例如celecoxib)、干扰素、细胞因子、结合一种或多种以下靶物的拮抗剂(例如中和性抗体)(ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-β、BlyS、APRIL、BCMA或VEGF受体、TRAIL/Apo2)、和其它生物活性和有机化学剂,等。本发明还包括它们的组合。

[0142] “血管发生因子”或“血管发生剂”指涉及刺激血管发育,例如促进血管发生(angiogenesis)、内皮细胞生长、血管稳定性和/或血管生成(vasculogenesis)等的生长因子或其受体。例如,血管发生因子包括但不限于例如VEGF和VEGF家族的成员及其受体(VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3)、PDGF、PDGF家族、成纤维细胞生长因子家族(FGF)、TIE配体(血管生成素、ANGPT1、ANGPT2)、TIE1、TIE2、ephrin、Bv8、德尔塔样配体4(DLL4)、Del-1、酸性(aFGF)和碱性(bFGF)成纤维细胞生长因子、FGF4、FGF9、BMP9、BMP10、卵泡抑素(Follistatin)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、GM-CSF、肝细胞生长因子(HGF)/散射因子(SF)、白介素-8(IL-8)、CXCL-12、Leptin、Midkine、神经毡蛋白、NRP1、NRP2、胎盘生长因子、血小板衍生内皮细胞生长因子(PD-ECGF)、血小板衍生生长因子尤其是PDGF-BB、PDGFR-α、或PDGFR-β、Pleiotrophin(PTN)、Progranulin、Proliferin、转化生长因子-α(TGF-α)、转化生长因子-β(TGF-β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、Alk1、CXCR4、Notch1、Notch4、Sema3A、Sema3C、Sema3F、Robo4、等。它会进一步包括促进血管发生的因子,诸如ESM1和Perlecan。它还包括加速伤口愈合的因子,诸如生长激素、胰岛素样生长因子-I(IGF-I)、VIGF、表皮生长因子(EGF)、EGF样域,多重7(EGFL7)、CTGF及其家族的成员、及TGF-α和TGF-β。参见例如Klagsbrun and D' Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179; Ferrara&Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini等(2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (例如列举已知血管发生因子的表1); Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206。

[0143] “抗血管发生剂”或“血管发生抑制剂”指或直接或间接抑制血管发生(angiogenesis)、血管生成(vasculogenesis)、或不想要的血管通透性的小分子量物质、多核苷酸(包括例如抑制性RNA(RNAi或siRNA))、多肽、分离的蛋白质、重组蛋白、抗体、或其偶联物或融合蛋白。应当理解,抗血管发生剂包括那些结合并阻断血管发生因子或其受体的血管发生活性的药剂。例如,抗血管发生剂是上文定义的血管发生剂的抗体或其它拮抗剂,例如VEGF-A的或VEGF-A受体(例如KDR受体或Flt-1受体)的抗体、抗PDGFR抑制剂、阻断VEGF受体信号传导的小分子(例如PTK787/ZK2284、SU6668、**SUTENT®/SU11248**(sunitinib malate)、AMG706、或那些记载于例如国际专利公开文本WO 2004/113304的)。抗血管发生剂包括但不限于下述药剂:VEGF抑制剂诸如VEGF特异性拮抗剂、EGF抑制剂、EGFR抑制剂、**Erbix®**(cetuximab, ImClone Systems, Inc., Branchburg, N. J.)、**Vectibix®**(panitumumab, Amgen, Thousand Oaks, CA)、TIE2抑制剂、IGF1R抑制剂、COX-II(环氧合酶II)抑制剂、MMP-2(基质金属蛋白酶2)抑制剂、和MMP-9(基质金属蛋白酶9)抑制剂、CP-547,632(Pfizer Inc., NY, USA)、Axitinib(Pfizer Inc.; AG-013736)、ZD-6474(AstraZeneca)、AEE788(Novartis)、AZD-2171)、VEGF Trap(Regeneron/Aventis)、Vatalanib(也称作PTK-787, ZK-222584:Novartis&Schering A G)、Macugen(pegaptanib octasodium, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech)、IM862(Cytran Inc. of Kirkland, Wash., USA); 和angiozyme(一种来自Ribozyme(Boulder, Colo.)和Chiron(Emeryville, Calif.)的合成

核酶)及其组合。其它血管发生抑制剂包括血小板反应蛋白1、血小板反应蛋白2、胶原IV和胶原XVIII。VEGF抑制剂披露于美国专利No.6,534,524和No.6,235,764,完整收录二者用于所有目的。抗血管发生剂还包括天然血管发生抑制剂,例如血管他丁(angiostatin)、内皮他丁(endostatin)、等。参见例如Klagsbrun and D'Amore(1991)Annu.Rev.Physiol.53:217-39;Streit and Detmar(2003)Oncogene 22:3172-3179(例如列举恶性黑素瘤中抗血管发生疗法的表3);Ferrara&Alitalo(1999)Nature Medicine 5(12):1359-1364;Tonini et al.(2003)Oncogene 22:6549-6556(例如列举已知抗血管发生因子的表2);及Sato(2003)Int.J.Clin.Oncol.8:200-206(例如列举临床试验中所使用的抗血管发生剂的表1)。

[0144] 术语“抗血管发生疗法”指对于抑制血管发生有用的疗法,其包括施用抗血管发生剂。

[0145] 术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。该术语意图包括:放射性同位素,例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素;化疗剂,例如甲氨蝶呤(methotrexate)、阿霉素(adriamycin)、长春花生物碱类(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide)、多柔比星(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素(mitomycin)C、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;和毒素,诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和/或变体;及下文披露的各种抗肿瘤药或抗癌药。下文记载了其它细胞毒剂。杀肿瘤药引起肿瘤细胞的破坏。

[0146] “毒素”指能够对细胞的生长或增殖产生有害效果的任何物质。

[0147] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的实例包括烷化剂类(alkylating agents),诸如塞替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide)(**CYTOXAN®**);磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates),诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类(aziridines),诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredepa);乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);番荔枝内酯类(acetogenin)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol),**MARINOL®**); β -拉帕醌(lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙素类(colchicines);白桦脂酸(betulinic acid);喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物托泊替康(topotecan)(**HYCAMTIN®**))、CPT-11(伊立替康(irinotecan),**CAMPTOSAR®**)、乙酰喜树碱、东莨菪亭(scopoletin)和9-氨基喜树碱);苔藓抑素(bryostatin);callystatin;CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);鬼臼毒素(podophyllotoxin);鬼臼酸(podophyllinic acid);替尼泊苷(teniposide);隐藻素类(cryptophycins)(特别是隐藻素1和隐藻素8);多拉司他汀(dolastatin);duocarmycin(包括合成类似物,KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素

(eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素 (enediynes) (如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见例如 Nicolaou et al., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994))); CDP323, 一种口服 α -4 整联蛋白抑制剂; 蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括 dynemicin A; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星 (doxorubicin) (包括 **ADRIAMYCIN®**、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射剂 (**DOXIL®**)、脂质体多柔比星 TLC D-99 (**MYOCET®**)、PEG 化脂质体多柔比星 (**CAELYX®**)、和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨蝶呤、吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**)、替加氟 (tegafur) (**UFTORAL®**)、卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**)、埃坡霉素 (epothilone) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 考布他汀 (combretastatin); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡醛内酯 (aceglatone); 醛磷

酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defosfamide);地美可辛(demecolcine);地吡醌(diaziquone);elfornithine;依利醋铵(elliptinium acetate);epothilone;依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟脲(hydroxyurea);香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidamine);美登木素生物碱类(maytansinoids),诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吡啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙基酰肼(ethylhydrazide);丙卡巴肼(procarbazine);**PSK®**多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西索菲兰(sizofiran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢菌素类(trichothecenes)(尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verrucarin)A、杆孢菌素(roridin)A和蛇行菌素(anguidin));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine)(**ELDISINE®**,**FILDESIN®**);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C");塞替派(thiotepa);类紫杉醇(taxoids),例如帕利他塞(paclitaxel)(**TAXOL®**,Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、清蛋白改造的纳米颗粒剂型帕利他塞(**ABRAXANE™**)和多西他塞(doxetaxel)(**TAXOTERE®**,**Rhône-Poulenc**Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥(chlorambucil);6-硫鸟嘌呤(thioguanine);巯基嘌呤(mercaptapurine);甲氨蝶呤(methotrexate);铂类似物,诸如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)(例如**ELOXATIN®**)和卡铂(carboplatin);长春药类(vincas),其阻止微管蛋白聚合形成微管,包括长春碱(vinblastine)(**VELBAN®**)、长春新碱(vincristine)(**ONCOVIN®**)、长春地辛(vindesine)(**ELDISINE®**,**FILDESIN®**)、和长春瑞滨(vinorelbine)(**NAVELBINE®**);依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);米托蒽醌(mitoxantrone);亚叶酸(leucovorin);能灭瘤(novantrone);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素(daunomycin);氨基蝶呤(aminopterin);伊本膦酸盐(ibandronate);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMF0);类维A酸(retinoids),诸如维A酸(retinoic acid),包括贝沙罗汀(bexarotene)(**TARGRETIN®**);二膦酸盐类(bisphosphonates),诸如氯膦酸盐(clodronate)(例如**BONEFOS®**或**OSTAC®**)、依替膦酸钠(etidronate)(**DIDROCAL®**)、NE-58095、唑来膦酸/唑来膦酸盐(zoledronic acid/zoledronate)(**ZOMETA®**)、阿伦膦酸盐(alendronate)(**FOSAMAX®**)、帕米膦酸盐(pamidronate)(**AREDIA®**)、替鲁膦酸盐(tiludronate)(**SKELID®**)或利塞膦酸盐(risedronate)(**ACTONEL®**);以及曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是抑制牵涉异常细胞增殖的信号途经中的基因表达的反义寡核苷酸,诸如例如PKC- α 、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R)(例如依洛替尼

(erlotinib) (Tarceva™); 和降低细胞增殖的VEGF-A; 疫苗, 诸如THERATOPE®疫苗和基因疗法疫苗, 例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗; 拓扑异构酶1抑制剂(例如LURTOTECAN®); rmRH(例如ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); 哌立福辛(perifosine), COX-2抑制剂(如塞来考昔(celecoxib)或艾托考昔(etoricoxib)), 蛋白体抑制剂(例如PS341); bortezomib(VELCADE®); CCI-779; tipifarnib(R11577); orafenib, ABT510; Bcl-2抑制剂, 诸如oblimersen sodium(GENASENSE®); pixantrone; EGFR抑制剂; 酪氨酸激酶抑制剂; 丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂, 诸如雷帕霉素(rapamycin) (sirolimus, RAPAMUNE®); 法尼基转移酶抑制剂, 诸如lonafarnib(SCH 6636, SARASARTM); 及任何上述各项的药学可接受盐、酸或衍生物; 以及两种或更多种上述各项的组合, 诸如CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写)和FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATIN™)联合5-FU和亚叶酸的治疗方案的缩写), 及任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物; 以及两种或多种上述物质的组合。

[0148] 本文中定义的化疗剂包括“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”, 其作用于调节、降低、阻断、或抑制能促进癌症生长的激素的效果。它们自身可以是激素, 包括但不限于: 抗雌激素类和选择性雌激素受体调控物类(SERM), 包括例如他莫昔芬(tamoxifen) (包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和FARESTON®托瑞米芬(toremifene); 抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂, 诸如例如4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、MEGASE®醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、福美坦(formestane)、法偲唑(fadrozole)、RIVISOR®伏罗唑(vorozole)、FEMARA®来曲唑(letrozole)和ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole); 抗雄激素类, 诸如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡米特(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)、和戈舍瑞林(goserelin); 以及曲沙他滨(troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制牵涉异常(abherent)细胞增殖的信号途经中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如PKC- α 、Raf和H-Ras; 核酶, 诸如VEGF表达抑制剂(例如ANGIOZYME®核酶)和HER2表达抑制剂; 疫苗, 诸如基因疗法疫苗, 例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗; PROLEUKIN®rIL-2; LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂; ABARELIX®rmRH; 长春瑞滨(Vinorelbine)和埃斯波霉素(Esperamicins) (见美国专利No. 4,675,187); 及任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物; 以及两种或多种上述物质的组合。

[0149] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞生长的化合物或组合物。在一个实施方案中, 生长抑制剂是阻止或降低表达抗体所结合的抗原的细胞增殖的生长抑制性抗体。在另一个实施方案中, 生长抑制剂可以是显著降低处于S期的细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(处于S期以外的位置)的药剂, 诸如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春药类(vincas) (长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine))、紫杉烷类(taxanes)、和拓扑异构酶II抑制剂诸如多柔比星

(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。那些阻滞G1的药剂也溢出进入S期停滞,例如DNA烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和ara-C。更多信息可参见Mendelsohn和Israel编,《The Molecular Basis of Cancer》,第1章,题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and anti-neoplastic drugs”, Murakami等人, WB Saunders, Philadelphia, 1995, 例如第13页。紫杉烷类(紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel))是衍生自紫杉树的抗癌药。衍生自欧洲紫杉的多西他赛(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)是紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。紫杉醇和多西他赛促进由微管蛋白二聚体装配成微管并通过防止解聚使微管稳定,导致对细胞中有丝分裂的抑制。

[0150] “放射疗法”或“放疗”指使用定向伽马射线或贝塔射线来诱发对细胞的足够损伤,以限制细胞正常发挥功能的能力或全然破坏细胞。应当领会,本领域知道许多方式来确定治疗的剂量和持续时间。典型的治疗作为一次施用来给予,而典型的剂量范围为每天10-200个单位(戈瑞(Gray))。

[0151] 用于治疗目的的“哺乳动物”指归入哺乳类的任何动物,包括人,家畜和牲畜,及动物园动物、体育运动用动物、或宠物动物,诸如犬、马、猫、牛等。优选地,哺乳动物为人。

[0152] 本文中术语“抗体”以最广义使用,明确覆盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。

[0153] “分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指将会干扰该抗体的研究、诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在有些实施方案中,将抗体纯化至(1)根据例如Lowry法的测定,抗体重量超过95%,而在有些实施方案中,重量超过99%,(2)足以通过使用例如转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)根据还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE及使用例如考马斯蓝或银染色,达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0154] “天然抗体”指通常由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链间有变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫键。每条重链在一端具有一个可变域(V_H),接着是多个恒定域。每条轻链在一端具有一个可变域(V_L),而另一端是一个恒定域。轻链的恒定域与重链的第一恒定域排列在一起,而轻链的可变域与重链的可变域排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链与重链可变域之间形成界面。

[0155] 术语“恒定域”指免疫球蛋白分子中的如下部分,其相对于免疫球蛋白的其它部分,即含有抗原结合位点的可变域,具有更加保守的氨基酸序列。恒定域含有重链的C_H1、C_H2和C_H3域(合成CH)及轻链的C_L1(或CL)域。

[0156] 抗体的“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变域

可以称为“VH”。轻链的可变域可以称为“VL”。这些结构域一般是抗体的最易变部分且包含抗原结合位点。

[0157] 术语“可变的”指可变域中的某些部分在抗体间序列差异广泛且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而,变异性并非均匀分布于抗体的整个可变域。它集中于轻链和重链可变域中称作高变区(HVR)的三个区段。可变域中更加高度保守的部分称作框架区(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR区,它们大多采取 β -折叠片构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的三个HVR连接。每条链中的HVR通过FR区非常接近的保持在一起,并与另一条链的HVR一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体在抗体依赖性细胞的细胞毒性中的参与。

[0158] 根据其恒定域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可归入两种截然不同的型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

[0159] 如本文中使用的,术语IgG“同种型”或“亚类”意指由其恒定区的化学和抗原特征定义的任何免疫球蛋白亚类。

[0160] 根据其重链恒定域的氨基酸序列,抗体(免疫球蛋白)可归入不同的类。免疫球蛋白有五大类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中有些可进一步分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。将与不同类的免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的,一般性描述于例如Abbas et al., Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)。抗体可以是抗体与一种或多种其它蛋白质或肽共价或非共价连接而形成的更大融合分子的一部分。

[0161] 术语“全长抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用,指基本上完整形式的抗体,而非下文定义的抗体片段。该术语具体指重链包含Fc区的抗体。

[0162] “裸抗体(裸露的抗体)”为本发明目的指未偶联细胞毒性模块或放射性标记物的抗体。

[0163] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0164] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各自具有一个抗原结合位点,及一个剩余的“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个F(ab')₂片段,它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

[0165] “Fv”是包含完整抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施方案中,双链Fv种类由紧密、非共价结合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)种类中,一个重链可变域和一个轻链可变域可以通过柔性肽接头共价相连接,使得轻链和重链可以在与双链Fv种类类似的“二聚体”结构中相结合。正是在这种构造中,每个可变域的三个HVR相互作用而在V_H-V_L二聚体表面上限定了一个抗原结合位点。六个HVR一起赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或是只包含对抗原特异性的三个HVR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是亲和力低于完整结合位点。

[0166] Fab片段包含重链和轻链可变域,而且还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于重链CH1结构域的羧基末端增加了少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带游离硫醇基的Fab'的称谓。F(ab')₂抗体片段最初是作为在Fab'片段之间有铰链半胱氨酸的成对Fab'片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0167] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于一条多肽链上。一般而言,scFv多肽在V_H与V_L结构域之间进一步包含多肽接头,其使得scFv能够形成结合抗原的期望结构。关于scFv的综述参见例如Plückthun,于《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,1994,第269-315页。

[0168] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的抗体片段,该片段在同一条多肽链(V_H-V_L)中包含相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对,迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。双抗体可以是二价的或双特异性的。双抗体更完整的记载于例如EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson et al.,Nat.Med.9:129-134(2003);及Hollinger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三抗体(Triabody)和四抗体(tetrabody)也记载于Hudson et al.,Nat.Med.9:129-134(2003)。

[0169] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,例如构成群体的各个抗体相同,除了可能以极少量存在的可能的突变,例如天然存在的突变。如此,修饰语“单克隆”表明抗体不是分立的抗体的混合物的特征。在某些实施方案中,此类单克隆抗体典型的包括包含结合靶物的多肽序列的抗体,其中靶物结合多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择单一靶物结合多肽序列在内的过程得到的。例如,选择过程可以从众多克隆诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的集合中选择独特克隆。应当理解,所选择的靶物结合序列可进一步改变,例如为了提高对靶物的亲和力、将靶物结合序列人源化、提高其在细胞培养物中的产量、降低其在体内的免疫原性、创建多特异性抗体等,而且包含改变后的靶物结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性外,单克隆抗体制备物的优势在于它们通常未受到其它免疫球蛋白的污染。

[0170] 修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如,将依照本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术来生成,包括例如杂交瘤法(例如Kohler and Milstein,Nature,256:495-97(1975);Hongo et al.,Hybridoma,14(3):253-260(1995),Harlow et al.,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版1988);Hammerling et al.,于:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA法(参见例如美国专利No.4,816,567)、噬菌体展示技术(参见例如Clackson et al.,Nature352:624-628(1991);Marks et al.,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Sidhu et al.,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee et al.,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);Lee et al.,

J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004))、及用于在具有部分或整个人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中生成人或人样抗体的技术(参见例如WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551(1993);Jakobovits et al.,Nature 362:255-258(1993);Bruggemann et al.,Year in Immuno.7:33(1993);美国专利No.5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016;Marks et al.,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg et al.,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-813(1994);Fishwild et al.,Nature Biotechnol.14:845-851(1996);Neuberger, Nature Biotechnol.14:826(1996);Lonberg and Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。

[0171] 单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(参见例如美国专利No.4,816,567;Morrison et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。嵌合抗体包括“灵长类化”抗体,其中抗体的抗原结合区衍生自通过例如用感兴趣抗原免疫猕猴而生成的抗体。

[0172] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在一个实施方案中,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的HVR残基用具有期望特异性、亲和力和/或能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、家兔、或非人灵长类动物的HVR残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的FR残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。可以进行这些修饰来进一步改进抗体的性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见例如Jones et al.,Nature 321:522-525(1986);Riechmann et al.,Nature 332:323-329(1988);和Presta, Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还可参见例如Vaswani and Hamilton, Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions23:1035-1038(1995);Hurle and Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);及美国专利No.6,982,321和7,087,409。

[0173] “人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom and Winter,J.Mol.Biol.227:381(1991);Marks et al., J.Mol.Biol.222:581(1991))。还可用于制备人单克隆抗体的是以下文献中记载的方法: Cole et al.,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77(1985); Boerner et al.,J.Immunol.147(1):86-95(1991)。还可参见van Dijk and van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.,5:368-74(2001)。可通过给已经修饰以应答抗原性刺激而生成抗体但其内源基因组已经失能的转基因动物例如经过免疫的异种小鼠(xenomice)

施用抗原来制备人抗体(参见例如6,075,181和6,150,584,关于XENOMOUSE™技术)。还可参见例如Li et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,103:3557-3562(2006),关于经人B-细胞杂交瘤技术生成的人抗体。

[0174] “物种依赖性抗体”指对来自第一哺乳动物物种的抗原的结合亲和力强于对来自第二哺乳动物物种的该抗原同系物的亲和力的抗体。通常,物种依赖性抗体“特异性结合”人抗原(例如结合亲和力(K_a)数值不超过大约 $1 \times 10^{-7}M$,优选不超过大约 $1 \times 10^{-8}M$,且优选不超过大约 $1 \times 10^{-9}M$),但是对来自第二非人哺乳动物物种的该抗原同系物的结合亲和力比对人抗原的结合亲和力弱至少大约50倍、或至少大约500倍、或至少大约1000倍。物种依赖性抗体可以是上文所定义的各种类型抗体中的任一种,但是优选人源化抗体或人抗体。

[0175] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”在用于本文时指抗体可变域中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环的区域。通常,抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1、H2、H3),三个在VL中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3和L3展示这六个HVR的最大多样性,而且认为特别是H3在赋予抗体以精密特异性中发挥独特作用。参见例如Xu et al.,*Immunity* 13:37-45(2000); Johnson and Wu,于:*Methods in Molecular Biology* 248:1-25(Lo,ed.,Human Press,Totowa,NJ,2003)。事实上,仅由重链组成的天然存在camelid抗体在缺乏轻链时是有功能的且稳定的。参见例如Hamers-Casterman et al.*Nature*363:446-448,(1993);Sheriff et al.*Nature Struct.Biol.*3:733-736,(1996)。

[0176] 本文中使用的且涵盖许多HVR的叙述。Kabat互补决定区(CDR)是以序列变异性为基础的,而且是最常用的(Kabat et al.,*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。Chothia改为指结构环的位置(Chothia and Lesk *J.Mol.Biol.*196:901-917(1987))。AbM HVR代表Kabat HVR与Chothia结构环之间的折衷,而且得到Oxford Molecular的AbM抗体建模软件的使用。“接触”HVR是以对可获得的复合物晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些HVR中每一个的残基。

	环	Kabat	AbM	Chothia	接触
	---	-----	-----	-----	-----
	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
[0177]	H1	H31-H35B (Kabat编号)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	H1	H31-H35 (Chothia编号)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0178] HVR可包括如下“延伸的HVR”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-

97或89-96 (L3) 及VH中的26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2) 和93-102、94-102或95-102 (H3)。对于这些定义中的每一个,可变域残基是依照Kabat等,见上文编号的。

[0179] “框架”或“FR”残基指可变域中除本文中所定义的可变域残基外的残基。

[0180] 术语“依照Kabat的可变域残基编号方式”或“依照Kabat的氨基酸位置编号方式”及其变化形式指Kabat et al.,见上文中的用于抗体重链可变域或轻链可变域编辑的编号系统。使用此编号系统,实际的线性氨基酸序列可包含较少或另外的氨基酸,对应于可变域FR或HVR的缩短或插入。例如,重链可变域可包含H2残基52后的单一氨基酸插入(依照Kabat为残基52a)及重链FR残基82后的插入残基(例如依照Kabat为残基82a、82b和82c等)。给定抗体的Kabat残基编号方式可通过将抗体序列与“标准”Kabat编号序列对比同源区来确定。

[0181] Kabat编号系统一般在提及可变域中的残基(大约是轻链残基1-107和重链残基1-113)时使用(例如Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。“EU编号系统”或“EU索引”一般在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用(例如Kabat et al., 见上文中报道的EU索引)。“如Kabat中的EU索引”指人IgG₁EU抗体的残基编号方式。

[0182] 表述“线性抗体”指Zapata等(1995) Protein Eng, 8 (10):1057-1062中所描述的抗体。简言之,这些抗体包含一对串联的Fd区段(V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}),该区段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的,或者是单特异性的。

[0183] 在用于本文时,“文库”或“库”指众多抗体或抗体片段序列(例如本发明的多肽),或者编码这些序列的核酸,变异氨基酸组合方面不同的序列根据本发明方法导入这些序列。

[0184] “噬菌体展示”是一种将变体多肽作为与外壳蛋白至少一部分的融合蛋白展示在噬菌体(例如丝状噬菌体)颗粒表面上的技术。噬菌体展示的效用在于能够对随机化蛋白质变体的大型文库快速且高效分选那些能以高亲和力与靶抗原结合的序列的实情。肽和蛋白质文库在噬菌体上的展示已经用于对数以百万计的多肽筛选那些具有特异性结合特性的多肽。多价噬菌体展示法已经用于展示小随机肽和小蛋白,其通过与丝状噬菌体的基因III或基因VIII融合来实现。Wells and Lowman (1992) Curr. Opin. Struct. Biol. 3:355-362,及其中引用的参考文献。在单价噬菌体展示中,将蛋白质或肽文库与基因III或其一部分融合,并在存在野生型基因III蛋白时以低水平表达,使得噬菌体颗粒展示一个拷贝的融合蛋白或者不展示融合蛋白。亲合效应(avidity effect)相对于多价噬菌体得到了降低,使得分选基于内在的配体亲和力,而且使用噬菌体载体,这简化了DNA操作。Lowman and Wells (1991) Methods: A companion to Methods in Enzymology 3:205-0216。

[0185] “噬菌粒”是具有细菌复制起点(例如Co1E1)和一个拷贝的噬菌体基因区间的质粒载体。噬菌粒可利用任何已知噬菌体,包括丝状噬菌体和λ类噬菌体。质粒一般也包含抗生素抗性的可选择标志物。克隆入这些载体的DNA区段可以像质粒一起而扩增。在给容纳这些载体的细胞提供生成噬菌体颗粒所必需的所有基因时,质粒的复制模式变成滚环复制,以生成质粒DNA的一条链的拷贝,并包装噬菌体颗粒。噬菌粒可形成感染性或非感染性噬菌体颗粒。此术语包括这样的噬菌粒,它们包含与异源多肽基因连接成基因融合物的噬菌体外壳蛋白基因或其片段,使得异源多肽展示在噬菌体颗粒的表面上。

[0186] II. 用于实施本发明的方法

[0187] 本文中的发明涉及包含抗体的稳定的含水配制剂。配制剂中的抗体使用本领域中用于生成抗体的可用技术来制备,下述各节更为详细地描述了其例示性方法。

[0188] 抗体针对感兴趣抗原。优选地,抗原是生物学重要多肽,而且对罹患病症的哺乳动物施用抗体可在该哺乳动物中导致治疗好处。然而,也涵盖针对非多肽抗原的抗体。

[0189] 在抗原是多肽的情况中,它可以是跨膜分子(例如受体)或配体,诸如生长因子。例示性抗原包括如下分子,诸如血管内皮生长因子(VEGF);ox-LDL;ox-ApoB100;肾素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A-链;胰岛素B-链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;黄体化激素;高血糖素;凝固因子,诸如因子VIIIc、因子IX、组织因子、和(冯)维勒布兰德(von Willebrand)氏因子;抗凝固因子,诸如蛋白C;心房钠因子;肺表面活性剂;纤溶酶原活化剂,诸如尿激酶或人尿型或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA);林蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和- β ;脑啡肽酶;RANTES(活化时受到调节,正常情况由T-细胞表达和分泌);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清清蛋白,诸如人血清清蛋白;穆勒(Muellerian)抑制性物质;松弛素A-链;松弛素B-链;松弛素原;小鼠促性腺素相关肽;微生物蛋白质,诸如 β -内酰胺酶;DNA酶;IgE;细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原(CTLA),诸如CTLA-4;抑制素;活化素;激素或生长因子的受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子,诸如骨衍生神经营养因子(BDNF)、神经营养蛋白-3、-4、-5、或-6(NT-3、NT-4、NT-5、或NT-6),或神经生长因子,诸如NGF- β ;血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子,诸如aFGF和bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),诸如TGF- α 和TGF- β ,包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、或TGF- β 5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I),胰岛素样生长因子结合蛋白;CD蛋白,诸如CD3、CD4、CD8、CD19和CD20;红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态生成蛋白(BMP);干扰素,诸如干扰素- α 、- β 、和- γ ;集落刺激因子(CSF),例如M-CSF、GM-CSF、和G-CSF;白介素(IL),例如IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T-细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原,诸如例如AIDS被膜的一部分;运输蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;整联蛋白,诸如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肿瘤相关抗原,诸如HER2、HER3或HER4受体;和任何上文所列多肽的片段。

[0190] 在本发明的某些实施方案中,本发明所涵盖的抗体的分子靶包括VEGF。在一个实施方案中,本文中的抗体为一种结合人VEGF的抗体。

[0191] A. 配制剂的制备

[0192] 在制备感兴趣抗体之后(例如用于生产可如本文所述配制的抗体的技术会在下文中详述且是本领域已知的),制备包含它的药物配制剂。在某些实施方案中,要配制的抗体未进行在先冻干,而且本文中的感兴趣配制剂是含水配制剂。在某些实施方案中,抗体为全长抗体。在一个实施方案中,配制剂中的抗体为抗体片段,诸如F(ab')₂,在该情况中可能需要解决全长抗体可能不会发生的问题(诸如将抗体修剪成Fab)。考虑例如施用的期望剂量体积和模式来决定配制剂中存在的抗体的治疗有效量。约0.1mg/mL至约250mg/mL、或约10mg/mL至约200mg/mL或约50mg/mL至约175mg/mL是配制剂中的例示性抗体浓度。

[0193] 制备在pH缓冲溶液中包含抗体的含水配制剂。本发明的缓冲液具有在约4.0至约6.5的范围中的pH。在某些实施方案中,pH在pH 4.25至6.25的范围中,或在pH 4.5至6.0的范围中,或在pH 4.75至5.75的范围中,或在pH 5.0至5.5的范围中,或在pH 5.1至5.4的范

围中。在本发明的某些实施方案中,配制剂具有5.2或约5.2的pH。控制pH在此范围内的缓冲液例子包括乙酸盐(例如精氨酸乙酸盐或乙酸钠)、琥珀酸盐(诸如精氨酸琥珀酸盐或琥珀酸钠)、葡萄糖酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸缓冲液及其组合。缓冲液浓度可以为约1mM至约600mM,取决于例如配制剂的缓冲液和期望等张性。在某些实施方案中,缓冲液含有浓度为50mM至500mM、75mM至400mM、100mM至250mM、120mM至240mM、150mM至225mM、或175mM至210mM的精氨酸。在本发明的某些实施方案中,缓冲液含有浓度为200mM或约200mM的精氨酸。在一个实施方案中,缓冲液为精氨酸乙酸盐(例如200mM或约200mM),pH 5.2。

[0194] 可任选地将表面活性剂添加至抗体配制剂。例示性表面活性剂包括非离子型表面活性剂,诸如聚山梨酯(例如聚山梨酯20、80等)或Poloxamer类(例如Poloxamer 188)。所添加的表面活性剂的量使得它降低所配制的抗体的聚集和/或使配制剂中的颗粒形成降至最低和/或降低吸附。例如,配制剂中存在的表面活性剂的量可以为约0.001%至约0.5%,约0.005%至约0.2%,约0.01%至约0.1%,或约0.02%至约0.06%,或约0.03%至约0.05%。在某些实施方案中,表面活性剂以0.04%或约0.04%的量存在于配制剂中。在一个实施方案中,配制剂不包含表面活性剂。

[0195] 在一个实施方案中,配制剂含有上文所述药剂(例如抗体、缓冲液、和/或表面活性剂)且基本上没有一种或多种防腐剂,诸如苯甲醇、酚、间甲酚、氯丁醇和苜索氯铵。在另一个实施方案中,配制剂中可包括防腐剂,特别是配制剂为多剂配制剂的情况。防腐剂的浓度可以在约0.1%至约2%,优选约0.5%至约1%的范围中。配制剂中可包括一种或多种其它药学可接受载体、赋形剂或稳定剂,诸如那些在Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)中记载的,只要它们对配制剂的期望特征没有不利影响。可接受载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括别的缓冲剂;共溶剂;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;螯合剂,诸如EDTA;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);生物可降解聚合物,诸如聚酯;和/或成盐反荷离子。本文中的例示性药学可接受载体进一步包括间质药物分散剂诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP及使用方法(包括rHuPH20)记载于美国专利公开文本No. 2005/0260186和No. 2006/0104968。在一个方面,sHASEGP与一种或多种别的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0196] 虽然本文中对螯合剂的各种描述常常集中于EDTA,但是要领会其它金属离子螯合剂也涵盖在本发明内。金属离子螯合剂是本领域技术人员公知的,而且包括但不必然限于氨基聚羧酸酯、EDTA(乙二胺四乙酸)、EGTA(乙二醇-二(β-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸)、NTA(氮川三乙酸)、EDDS(乙二胺二琥珀酸盐)、PDTA(1,3-丙二胺四乙酸)、DTPA(二乙撑三胺五乙酸)、ADA(β-丙氨酸二乙酸)、MGCA(甲基甘氨酸二乙酸)、等。另外,本文中的一些实施方案包含膦酸盐/膦酸螯合剂。

[0197] 本文中的配制剂还可含有超过一种对所治疗的特定适应证必需的蛋白质,优选那些具有互补活性的、对其它蛋白质没有不利影响的。例如,在抗体是抗VEGF抗体的情况中,可将它与另一药剂(例如化疗剂和抗肿瘤剂)组合。

[0198] 要用于体内施用的配制剂应当是无菌的。这容易通过在制备配制剂之前或之后经由无菌过滤膜过滤来实现。

[0199] B. 配制剂的施用

[0200] 依照已知方法将配制剂施用于需要用抗体治疗的哺乳动物, 优选人, 诸如静脉内施用, 作为推注 (bolus) 或通过一段时间里的连续输注, 通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、表面、或吸入路径。在一个实施方案中, 通过静脉内施用将配制剂施用于哺乳动物。为了此类目的, 可例如使用注射器或经IV线注射配制剂。在一个实施方案中, 通过皮下施用将配制剂施用于哺乳动物。

[0201] 抗体的适宜剂量 (“治疗有效量”) 将取决于例如要治疗的状况、状况的严重性和过程、施用抗体是为了预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床史和对抗体的响应、所使用的抗体的类型、和主治内科医师的判断。将抗体以一次或在一系列治疗中合适地施用于患者, 而且可在诊断后的任何时间施用于患者。可作为唯一治疗或与在治疗所讨论的状况中有用的其它药物或疗法联合施用抗体。

[0202] 作为一般建议, 所施用的抗体的治疗有效量会在约0.1至约50mg/kg患者体重的范围内, 无论是通过一次或多次施用, 所使用的抗体的典型范围为约0.3至约20mg/kg、优选约0.3至约15mg/kg, 例如每日施用。然而, 其它剂量方案也是有用的。在一个实施方案中, 拮抗剂是抗VEGF抗体, 以每1、2、3、或4周约100或400mg的剂量施用或以每1、2、3、或4周约1、3、5、7.5、10、15、或20mg/kg的剂量施用。剂量可以作为单剂或作为多剂 (例如2或3剂) 施用, 诸如输注。此疗法的进展容易通过常规技术来监测。

[0203] C. 抗体制备

[0204] (i) 抗原制备

[0205] 可溶性抗原或其片段 (任选偶联有其它分子的) 可作为免疫原用于生成抗体。对于跨膜分子, 诸如受体, 它们的片段 (例如受体的胞外结构域) 可用作免疫原。或者, 表达跨膜分子的细胞可用作免疫原。此类细胞可衍生自天然来源 (例如癌细胞系), 或者可以是经重组技术转化而表达跨膜分子的细胞。对于制备抗体有用的其它抗原及其形式对于本领域技术人员会是显而易见的。

[0206] (ii) 某些基于抗体的方法

[0207] 多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂来生成。使用双功能或衍生化试剂, 例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, 其中R和 R^1 是不同的烃基, 将相关抗原与在待免疫物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的, 例如匙孔虫凝血蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0208] 通过将例如100 μg 或5 μg 蛋白质或偶联物 (分别用于兔或小鼠) 与3倍体积的弗氏完全佐剂混和并将该溶液皮内注射于多个部位, 将动物针对抗原、免疫原性偶联物或衍生物进行免疫。一个月后, 通过多个部位的皮下注射, 用弗氏完全佐剂中初始量1/5-1/10的肽或偶联物对动物进行加强免疫。7-14天后, 采集动物的血液, 并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫, 直到滴度达到平台 (plateau)。优选的是, 将动物用相同抗原但与不同蛋白质和/或通过不同交联剂偶联得到的偶联物进行加强免疫。偶联物还可在重组细胞培养中作为蛋白质融合物来制备。同样, 适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。

[0209] 本发明的单克隆抗体可使用杂交瘤方法来生成, 其首先记载于Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), 并进一步记载于例如Hongo et al., Hybridoma, 14 (3):253-260

(1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), 和 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26 (4): 265-268 (2006), 关于人-人杂交瘤。别的方法包括那些记载于例如 U.S. Pat. No. 7,189,826 的, 其关于自杂交瘤细胞系生成单克隆人天然 IgM 抗体。人杂交瘤技术 (三元杂交瘤 (Trioma) 技术) 记载于 Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3): 927-937 (2005) 和 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27 (3): 185-91 (2005)。

[0210] 关于各种杂交瘤技术, 参见例如 US 2006/258841; US 2006/183887 (完全人的抗体); US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; 和 U.S. Pat. Nos. 7,078,492 和 7,153,507。一种使用杂交瘤方法来生成单克隆抗体的例示性方案记载如下。在一个实施方案中, 免疫小鼠或其它适宜宿主动物 (诸如仓鼠) 以引发生成或能够生成会特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。通过多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射本发明的多肽或其片段和佐剂诸如单磷脂酰脂质 A (MPL) / 海藻糖二棒分枝菌酸酯 (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT), 在动物中生成抗体。本发明的多肽 (例如抗原) 或其片段可使用本领域公知方法来制备, 诸如重组方法, 其中一些在本文中有进一步描述。对来自经免疫动物的血清测定抗抗原抗体, 并任选施用加强免疫。自生成抗抗原抗体的动物分离淋巴细胞。或者, 在体外免疫淋巴细胞。

[0211] 然后使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞。参见例如 Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)。可使用高效融合、支持选定地抗体生成细胞稳定地高水平生成抗体、且对培养基诸如 HAT 培养基敏感的骨髓瘤细胞。例示性的骨髓瘤细胞包括但不限于鼠骨髓瘤细胞, 诸如那些衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤 (可得自索尔克 (Salk) 研究所细胞分发中心, San Diego, California USA) 的, 及 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞 (可得自美国典型培养物保藏中心, Rockville, Maryland USA) 的。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也记载用于生成人单克隆抗体 (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0212] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养, 例如含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质的培养基。例如, 若亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HGPRT 或 HPRT), 则用于杂交瘤的培养基典型的会含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷 (HAT 培养基), 这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。优选地, 使用无血清杂交瘤细胞培养方法来降低动物衍生血清的使用, 诸如胎牛血清, 如记载于例如 Even et al., *Trends in Biotechnology*, 24 (3), 105-108 (2006)。

[0213] 作为提高杂交瘤细胞培养物生产力的工具的寡肽记载于 Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005)。具体地, 标准培养基富含某些氨基酸 (丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、脯氨酸) 或蛋白质水解产物级分, 而且可通过由 3-6 个氨基酸残基构成的合成寡肽来显著遏制凋亡。所述肽以毫摩尔或更高浓度存在。

[0214] 可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养液测定结合本发明抗原的单克隆抗体的生

成。可通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,诸如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。单克隆抗体的结合亲和力可通过例如Scatchard分析来测定。参见例如Munson等,Anal. Biochem. 107:220 (1980)。

[0215] 在鉴定得到生成具有期望特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,该克隆可通过有限稀释规程进行亚克隆并通过标准方法进行培养(参见例如Goding, supra)。适于这一目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水瘤进行体内培养。可通过常规免疫球蛋白纯化规程,诸如例如蛋白A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养液、腹水或血清适当分开。一种用于自杂交瘤细胞分离蛋白质的规程记载于US 2005/176122和U.S. Pat. No. 6,919,436。该方法包括在结合过程中最低限度地使用盐,诸如易溶盐,而且优选还在洗脱过程中使用少量的有机溶剂。

[0216] (iii) 某些文库筛选方法

[0217] 本发明的抗体可以通过使用组合库筛选具有期望活性的抗体来生成。例如,本领域知道用于构建噬菌体展示库及对此类文库筛选具有期望的结合特性的抗体的多种方法。此类方法一般记载于Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)。例如,一种产生感兴趣抗体的方法是经由使用如Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340 (5):1073-93中所描述的噬菌体抗体文库。

[0218] 原则上,通过筛选噬菌体文库来选择合成的抗体克隆,所述噬菌体文库含有展示融合至噬菌体外壳蛋白的各种抗体可变区(Fv)片段的噬菌体。通过针对所需抗原的亲和层析来淘选此类噬菌体文库。表达能够结合所需抗原的Fv片段的克隆被吸附至抗原,从而与文库中不结合的克隆分开。然后将结合的克隆从抗原上洗脱,而且可以通过额外的抗原吸附/洗脱循环进一步富集。本发明的任何抗体可以如下获得,即设计合适的抗原筛选规程来选择感兴趣的噬菌体克隆,接着使用来自感兴趣的噬菌体克隆的Fv序列和Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 卷1-3中记载的合适的恒定区(Fc)序列来构建全长抗体克隆。

[0219] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合域由两个约110个氨基酸的可变(V)区形成,分别来自轻链(VL)和重链(VH),都呈现三个高变环(HVR)或互补决定区(CDR)。可变域可以功能性的展示在噬菌体上,或是作为单链Fv(scFv)片段(其中VH和VL通过短的、柔性的接头共价相连),或者作为Fab片段(其中它们各自与恒定域融合且非共价相互作用),如Winter等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994)所述。在用于本文时,编码scFv的噬菌体克隆和编码Fab的噬菌体克隆统称为“Fv噬菌体克隆”或“Fv克隆”。

[0220] VH和VL基因的全集可以通过聚合酶链式反应(PCR)分开克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以搜索抗原结合克隆,如Winter等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994)所述。来自经免疫来源的文库提供对免疫原有高亲和力的抗体,无需构建杂交瘤。或者,可以克隆未免疫的全集,用于为广泛的非自身的及自身的抗原提供单一抗体来源,无需任何免疫,如Griffiths等, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993)所述。最后,未免疫的文库还可以以合成方式来构建,即从干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用包含随机序列的PCR引物来编码高度可变的CDR3区及用来在体外实现重排,如Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*,

227:381-388 (1992) 所述。

[0221] 在某些实施方案中,通过与次要外壳蛋白pIII融合,使用丝状噬菌体来展示抗体片段。抗体片段可以展示为单链Fv片段,其中VH与VL结构域通过柔性多肽间隔物在同一多肽链上相连,例如如Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 所述,或者展示为Fab片段,其中一条链与pIII融合,另一条链分泌入细菌宿主细胞周质,在此装配Fab-外壳蛋白结构,其通过替换一些野生型外壳蛋白而展示在噬菌体表面上,例如如Hoogenboom等, *Nucl. Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991) 所述。

[0222] 一般而言,从收获自人或动物的免疫细胞获得编码抗体基因片段的核酸。如果希望文库偏向抗抗原克隆,那么可以给受试者免疫接种抗原以产生抗体应答,并回收脾细胞和/或循环B细胞或其它外周血淋巴细胞(PBL)用于文库构建。在一个实施方案中,如下得到了偏向抗抗原克隆的人抗体基因片段文库,即在携带功能性人免疫球蛋白基因阵列(且缺乏功能性内源抗体生成系统)的转基因小鼠中产生抗抗原抗体应答,使得抗原免疫接种产生生成针对抗原的人抗体的B细胞。生成人抗体的转基因小鼠的生成在下文中有描述。

[0223] 可以如下获得抗抗原反应性细胞群的进一步富集,即使用合适的筛选规程来分离表达抗原特异性膜结合抗体的B细胞,例如通过使用抗原亲和层析进行的细胞分离或者细胞对荧光染料标记的抗原的吸附及后续的荧光激活细胞分选(flow-activated cell sorting, FACS)。

[0224] 或者,来自未免疫供体的脾细胞和/或B细胞或其它PBL的使用提供了可能的抗体全集的更佳展现,而且还容许使用抗原在其中没有抗原性的任何动物(人或非人的)物种构建抗体文库。对于构建体外掺入抗体基因的文库,从受试者收获干细胞以提供编码未重排抗体基因区段的核酸。可以从多种动物物种(诸如人、小鼠、大鼠、兔类、luprine、犬、猫、猪、牛、马和禽类物种等)获得感兴趣的免疫细胞。

[0225] 从感兴趣的细胞回收编码抗体可变基因区段(包括VH和VL区段)的核酸并扩增。就重排的VH和VL基因文库而言,可以如下获得所需DNA,即从淋巴细胞分离基因组DNA或mRNA,接着用与重排的VH和VL基因的5'和3'末端匹配的引物进行聚合酶链式反应(PCR),如Orlandi等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:3833-3837 (1989) 所述,由此构建多样性V基因全集供表达。可以从cDNA和基因组DNA扩增V基因,反向引物位于编码成熟V结构域的外显子的5'末端,正向引物基于J区段内部,如Orlandi等(1989)和Ward等, *Nature*, 341:544-546 (1989) 所述。然而,为了从cDNA进行扩增,反向引物还可基于前导外显子内,如Jones等, *Biotechnol.*, 9:88-89 (1991) 所述,正向引物基于恒定区内,如Sastry等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:5728-5732 (1989) 所述。为了使互补性最大化,引物中可以掺入简并性,如Orlandi等(1989)或Sastry等(1989)所述。在某些实施方案中,如下将文库多样性最大化,即使用靶向每个V基因家族的PCR引物来扩增免疫细胞核酸样品中存在的的所有可获得的VH和VL重排,例如如Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 的方法中所述或Orum等, *Nucleic Acids Res.*, 21:4491-4498 (1993) 的方法中所述。为了将所扩增的DNA克隆入表达载体,可以在PCR引物的一端引入罕见的限制性位点作为标签,如Orlandi等(1989)所述,或者用带标签的引物进行进一步的PCR扩增,如Clackson等, *Nature*, 352:624-628 (1991) 所述。

[0226] 合成重排的V基因全集可以在体外从V基因区段衍生。大多数人VH基因区段已经克

隆和测序(Tomlinson等, *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992)), 并定位(Matsuda等, *Nature Genet.*, 3:88-94 (1993)); 这些克隆的区段(包括H1和H2环的所有主要构造)可用于生成多样性VH基因全集, 用到编码序列和长度多样性的H3环的PCR引物, 如Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992)所述。VH全集还可如下生成, 所有序列多样性集中于单一长度的长H3环, 如Barbas等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4457-4461 (1992)所述。人Vk和Vλ区段已经克隆和测序(Williams和Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23:1456-1461 (1993)), 而且可用于生成合成轻链全集。基于一系列VH和VL折叠结构及L3和H3长度的合成V基因全集将编码具有可观结构多样性的抗体。扩增编码V基因的DNA后, 依照Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992)的方法, 可以在体外重排种系V基因区段。

[0227] 抗体片段全集可以如下构建, 即以数种方式将VH与VL基因全集联合在一起。可以在不同载体中创建各个全集, 并在体外重组载体, 例如如Hogrefe等, *Gene*, 128:119-126 (1993)所述, 或者在体内通过组合感染来重组载体, 例如Waterhouse等, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)中记载的loxP系统。体内重组方法利用Fab片段的双链性质来克服因大肠杆菌转化效率施加的库容量限制。分开克隆未免疫的VH和VL全集, 一个克隆入噬菌粒, 另一个克隆入噬菌体载体。然后通过用噬菌体感染含噬菌粒的细菌使得每个细胞包含一种不同组合来联合两个文库, 库容量只受细胞存在数的限制(约 10^{12} 个克隆)。两种载体都包含体内重组信号, 使得VH与VL基因重组到单一复制子上, 并共包装成噬菌体病毒粒。这些巨型文库提供了大量的具有优良亲和力(K_d^{-1} 为约 10^{-8} M)的多样性抗体。

[0228] 或者, 可以将全集序贯克隆入同一载体, 例如如Barbas等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991)所述, 或者通过PCR装配到一起, 然后克隆, 例如如Clackson等, *Nature*, 352:624-628 (1991)所述。PCR装配还可用于将VH和VL DNA与编码柔性肽间隔物的DNA连接以形成单链Fv(scFv)全集。在另一种技术中, “细胞内PCR装配”用于通过PCR在淋巴细胞内联合VH与VL基因, 然后克隆所连接基因的全集, 如Embleton等, *Nucl. Acids Res.*, 20:3831-3837 (1992)所述。

[0229] 未免疫文库(天然的或合成的)生成的抗体可具有中等亲和力(K_d^{-1} 为约 10^6 - 10^7 M $^{-1}$), 但还可以如下在体外模拟亲和力成熟, 即构建次生文库并再次选择, 如Winter等(1994), 见上文所述。例如, 在Hawkins等, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992)的方法或Gram等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580 (1992)的方法中, 使用易错聚合酶在体外随机引入突变(Leung等, *Technique*, 1:11-15 (1989))。另外, 可以通过随机突变一个或多个CDR来进行亲和力成熟, 例如在选定的个别Fv克隆中使用携带跨越感兴趣CDR的随机序列的引物进行PCR并筛选更高亲和力的克隆。WO 9607754(公布于1996年3月14日)记载了用于在免疫球蛋白轻链的互补决定区中诱导诱变以创建轻链基因文库的方法。另一种高效方法是将通过噬菌体展示选出的VH或VL结构域与得自未免疫供体的天然存在V结构域变体全集重组, 并在数轮链改组中筛选更高亲和力, 如Marks等, *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992)所述。此技术容许生成亲和力约 10^{-9} M或小于 10^{-9} M的抗体和抗体片段。

[0230] 文库的筛选可通过本领域已知的多种技术来实现。例如, 抗原可用于包被吸附板的孔, 在附着至吸附板的宿主细胞上表达, 或用于细胞分选, 或者偶联至生物素以用链霉亲和素包被的珠捕捉, 或者用于淘选噬菌体展示库的任何其它方法。

[0231] 在适于至少部分噬菌体颗粒结合吸附剂的情况下, 使噬菌体文库样品接触固定化

的抗原。正常情况下,选择包括pH、离子强度、温度等等的条件来模拟生理学条件。结合至固相的噬菌体进行清洗,然后用酸洗脱,例如如Barbas等,Proc.Natl.Acad.Sci USA,88:7978-7982(1991)所述,或者用碱洗脱,例如如Marks等,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)所述,或者通过抗原竞争洗脱,例如在与Clackson等,Nature,352:624-628(1991)的抗原竞争法类似的规程中。噬菌体在单轮选择中可以富集20-1,000倍。此外,富集的噬菌体可以在细菌培养物中进行培养,并进行更多轮选择。

[0232] 选择的效率取决于许多因素,包括清洗过程中解离的动力学,及单个噬菌体上的多个抗体片段是否能同时结合抗原。具有较快解离动力学(和弱结合亲和力)的抗体可以通过使用短时间的清洗、多价噬菌体展示、及固相中的高抗原包被密度来保留。高密度不仅通过多价相互作用而稳定了噬菌体,而且有利于已解离的噬菌体的再结合。具有较慢解离动力学(和强结合亲和力)的抗体的选择可以通过使用长时间的清洗和单价噬菌体展示(如Bass等,Proteins,8:309-314(1990)和WO 92/09690所述)及低抗原包被密度(如Marks等,Biotechnol.,10:779-783(1992)所述)来促进。

[0233] 有可能在对抗原具有不同亲和力的噬菌体抗体之间进行选择,甚至是亲和力略有差异的。然而,选定抗体的随机突变(例如如有些亲和力成熟技术中所进行的)有可能产生许多突变体,多数结合抗原,少数具有更高的亲和力。通过限制抗原,罕见的高亲和力噬菌体能竞争胜出。为了保留所有较高亲和力的突变体,可以将噬菌体与过量的生物素化抗原一起温育,但是生物素化抗原的浓度以摩尔计低于抗原的目标摩尔亲和常数。然后可以用链霉亲和素包被的顺磁珠捕捉高亲和力的结合噬菌体。此类“平衡捕捉”容许依照结合亲和力来选择抗体,其灵敏性容许从大大过量的低亲和力噬菌体中分离出亲和力只有原值2倍的突变体克隆。还可以操作用于清洗结合至固相的噬菌体的条件来进行基于解离动力学的区分。

[0234] 抗抗原克隆可以基于活性进行选择。在某些实施方案中,本发明提供了结合天然表达抗原的活细胞或结合游离漂浮抗原或附着于其它细胞结构的抗原的抗抗原抗体。对应于此类抗抗原抗体的Fv克隆可以如下选出:(1)如上所述从噬菌体文库分离抗抗原克隆,并任选通过在合适的细菌宿主中培养所分离的噬菌体克隆群来扩增该群体;(2)选出分别想要阻断和不阻断其活性的第二蛋白质和抗原;(3)使抗抗原噬菌体克隆吸附至固定化的抗原;(4)使用过量的第二蛋白质来洗脱任何不想要的、识别抗原结合决定簇(其与第二蛋白质的结合决定簇交叠或共享)的克隆;并(5)洗脱在步骤(4)后仍然吸附的克隆。任选的是,具有期望的阻断/不阻断特性的克隆可以通过一次或多次重复本文所述选择规程来进一步富集。

[0235] 编码本发明杂交瘤衍生单克隆抗体或噬菌体展示Fv克隆的DNA易于使用常规规程分离和测序(例如通过使用设计成自杂交瘤或噬菌体DNA模板特异性扩增感兴趣的重链和轻链编码区的寡核苷酸引物)。一旦分离,可将DNA置于表达载体中,然后将该表达载体转入原本不生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞,诸如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得所需单克隆抗体的合成。关于编码抗体的DNA在细菌中的重组表达的综述性论文包括Skerra等,Curr.Opinion in Immunol.,5:256(1993)及Pluckthun,Immunol.Revs,130:151(1992)。

[0236] 编码本发明Fv克隆的DNA可以联合编码重链和/或轻链恒定区的已知DNA序列(例

如适宜的DNA序列可得自Kabat等,见上文)以形成编码全长或部分长度重链和/或轻链的克隆。应当领会,任何同种型的恒定区都可用于此目的,包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区,而且此类恒定区可以得自任何人或动物物种。衍生自一种动物(诸如人)物种的可变域DNA,然后与另一动物物种的恒定区DNA融合以形成“杂合的”全长重链和/或轻链的编码序列的Fv克隆包括在本文所用“嵌合”和“杂合”抗体的定义中。在某些实施方案中,衍生自人可变DNA的Fv克隆与人恒定区DNA融合以形成全长或部分长度人重链和/或轻链的编码序列。

[0237] 还可以修饰编码衍生自本发明杂交瘤的抗抗原抗体的DNA,例如通过替代,即用人重链和轻链恒定域的编码序列替换衍生自杂交瘤克隆的同源鼠序列(例如如Morrison等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中的方法)。可以进一步修饰编码杂交瘤或Fv克隆衍生抗体或片段的DNA,通过共价连接免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列。可以以该方式制备具有本发明的Fv克隆或杂交瘤克隆衍生抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂合”抗体。

[0238] (iv) 人源化抗体和人抗体

[0239] 本领域知道用于人源化非人抗体的多种方法。例如,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称为“输入”残基,它们通常取自“输入”可变区。基本上可遵循Winter及其同事的方法进行人源化(Jones et al.,Nature,321:522-525(1986);Riechmann et al.,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen et al.,Science,239:1534-1536(1988)),即用啮齿类CDR或CDR序列替代人抗体的对应序列。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利4,816,567),其中显著少于完整的人可变区用非人物种的相应序列替代。在实践中,人源化抗体通常是如下人抗体,其中有些CDR残基和可能的有些FR残基用啮齿类抗体类似位点的残基替代。

[0240] 用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变区的选择对于降低抗原性是非常重要的。依照所谓的“最适(best-fit)”方法,用啮齿类抗体的可变区序列对已知人可变区序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架(FR)(Sims et al.,J.Immunol.,151:2296(1993);Chothia et al.,J.Mol.Biol.,196:901(1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚类(subgroup)的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架。相同框架可用于几种不同的人源化抗体(Carter et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);Presta et al.,J.Immunol.,151:2623(1993))。

[0241] 更为重要的是抗体在人源化后保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了达到此目的,依照该方法的一个实施方案,通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。通常可获得免疫球蛋白三维模型,这是本领域技术人员所熟悉的。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。通过检查这些显示图像能分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可以从受体序列和输入序列中选出FR残基并组合,从而得到期望的抗体特征,诸如对靶抗原的亲合力升高。一般而言,高变区残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

[0242] 本发明的人抗体可以通过如上所述联合选自人衍生噬菌体展示库的Fv克隆可变域序列与已知的人恒定域序列来构建。或者,可以通过杂交瘤方法来生成本发明的人单克隆抗体。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系已有记载,例如

Kozbor J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及 Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991)。

[0243] 例如,有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成成人抗体完整全集的转基因动物(例如小鼠)。例如,已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击后生成成人抗体。参见例如 Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); 及 Duchosal et al. *Nature* 355:258 (1992)。

[0244] 基因改组也可用于在体外自非人(例如啮齿类)抗体衍生人抗体,其中人抗体具有与起始非人抗体相似的亲和力和特异性。依照此方法,它也称为“表位印记”(epitope imprinting),如本文所述通过噬菌体展示技术得到的非人抗体片段的重链或轻链可变区用人V结构域基因全集替换,产生非人链-人链scFv或Fab嵌合物群。用抗原进行的选择导致非人链/人链嵌合scFv或Fab的分离,其中人链在一级噬菌体展示克隆中消除相应的非人链后恢复了抗原结合位点,即表位决定(印记,imprint)人链配偶体的选择。在重复该过程以替换剩余非人链时,得到人抗体(参见PCT WO 93/06213,公开于1993年4月1日)。与传统的通过CDR移植进行的非人抗体的人源化不同,此技术提供完全人的抗体,它们不含非人起源的FR或CDR残基。

[0245] (v) 抗体片段

[0246] 抗体片段可以通过传统手段来生成,诸如酶促消化,或者通过重组技术来生成。在某些情况中,使用抗体片段,而不是完整抗体有优势。片段的较小尺寸容许快速清除,而且可导致更易于到达实体瘤。某些抗体片段的综述参见Hudson等(2003) *Nat. Med.* 9:129-134。

[0247] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如Morimoto等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); 及 Brennan等, *Science* 229:81 (1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。Fab、Fv和scFv抗体片段都可在大肠杆菌中表达和由大肠杆菌分泌,如此容许容易地生成大量的这些片段。可从上文讨论的噬菌体抗体库中分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌回收Fab'-SH片段并化学偶联以形成F(ab')₂片段(Carter等, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。依照另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养物分离F(ab')₂片段。包含补救受体结合表位残基、具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段记载于美国专利No. 5,869,046。用于生成抗体片段的其它技术对于熟练从业人员会是显而易见的。在某些实施方案中,抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185;美国专利No. 5,571,894;及5,587,458。Fv和scFv是具有完整结合位点、缺少恒定区的唯一类型;如此,它们可能适于在体内使用时降低非特异性结合。可构建scFv融合蛋白以生成效应器蛋白质在scFv的氨基或羧基末端的融合。参见Antibody Engineering, Borrebaeck编,见上文。抗体片段还可以是“线性抗体”,例如如美国专利No. 5,641,870中所记载的。此类线性抗体可以是单特异性的或双特异性的。

[0248] (vi) 多特异性抗体

[0249] 多特异性抗体具有对至少两种不同表位的结合特异性,其中所述表位通常来自不同抗原。尽管此类分子通常只结合两种不同表位(即双特异性抗体,BsAb),但是此表述在用于本文时涵盖具有额外特异性的抗体,诸如三特异性抗体。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)。

[0250] 用于构建双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达,其中两种链具有不同的特异性(Millstein等,Nature,305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))生成10种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦且产物产量低。类似的规程披露于W093/08829及Traunecker等,EMBO J.,10:3655-3659(1991)。依照一种不同的方法,将具有期望结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。优选的是,与包含至少部分铰链、CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定域进行融合。通常在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物和,在需要时,免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体中,并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供所期望的最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比例表达导致高产量时或在该比例没有特别意义时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体。

[0251] 在该方法的一个实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了便利的分离途径,因此发现这种不对称结构便于将期望的双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法披露于W0 94/04690。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如Suresh等,Methods in Enzymology,121:210(1986)。

[0252] 依照W096/27011中记载的另一种方法,可改造一对抗体分子间的界面,以将从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。一种界面包含抗体恒定域的至少部分CH3结构域。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过将大氨基酸侧链用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

[0253] 双特异性抗体包括交联的或“异源偶联的”抗体。例如,可以将异源偶联物中的一种抗体与亲合素偶联,而将另一种抗体与生物素偶联。此类抗体已经建议用于例如将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利No.4,676,980)和用于治疗HIV感染(WO 91/00360,WO 92/200373,和EP 03089)。异源偶联抗体可以使用任何方便的交联方法来制备。合适的交联剂连同许多交联技术是本领域众所周知的,而且披露于美国专利No.4,676,980。

[0254] 文献中还记载了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan等,Science,229:81(1985)记载了通过蛋白水解切割完整抗体以生成F(ab')₂片段的规程。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的Fab'片段转变为硫代硝基苯甲

酸酯 (TNB) 衍生物。然后将 Fab'-TNB 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab'-硫醇, 并与等摩尔量的另一种 Fab'-TNB 衍生物混合, 以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

[0255] 最新的进展便于从大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段, 这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。也可以从大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段, 而且可以将这些片段化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) 记载了完全人源化的双特异性抗体 F(ab')₂ 分子的生成。由大肠杆菌分开分泌每种 Fab' 片段, 并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。

[0256] 还记载了从重组细胞培养物直接生成和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如, 已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553 (1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原以形成单体, 然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) 记载的“双抗体”技术提供了构建双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的重链可变域 (V_H) 和轻链可变域 (V_L), 所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此, 迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对, 由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体构建双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber 等, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)。

[0257] 设想了具有超过两个效价的抗体。例如, 可制备三特异性抗体。Tuft 等, *J. Immunol.*, 147:60 (1991)。

[0258] (vii) 单域抗体

[0259] 在有些实施方案中, 本发明的抗体是单域抗体 (single-domain antibody)。单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域或者整个或部分轻链可变域的单一多肽链。在某些实施方案中, 单域抗体是人单域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如美国专利 No. 6,248,516B1)。在一个实施方案中, 单域抗体由抗体的整个或部分重链可变域组成。

[0260] (viii) 抗体变体

[0261] 在有些实施方案中, 涵盖本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如, 可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过将适宜的变化引入编码抗体的核苷酸序列或通过肽合成制备的。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基删除和/或插入和/或替代。可进行任何删除、插入和替代组合以获得最终的构建物, 倘若最终的构建物具有期望的特征。可在制备序列时将氨基酸改变引入受试抗体的氨基酸序列。

[0262] (ix) 抗体衍生物

[0263] 可进一步修饰本发明的抗体以包含本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质模块。在某些实施方案中, 适于抗体衍生化的模块是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖苷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三口恶烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸 (均聚物或随机共聚物)、右旋糖苷或聚 (n-乙烯吡咯烷酮) 聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇 (例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量,而且可以是分支的或不分支的。附着于抗体的聚合物数目可以变化,而且如果附着了超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可根据下列考虑来确定用于衍生物的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于待改进抗体的具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

[0264] (x) 载体、宿主细胞、和重组方法

[0265] 也可以使用重组方法来生成抗体。为了重组生产抗抗原抗体,分离编码抗体的核酸,并将其插入可复制载体,用于进一步克隆(DNA扩增)或表达。可使用常规规程容易的分离编码抗体的DNA并测序(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针)。可利用许多载体。载体构件通常包括但不限于下列一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

[0266] (a) 信号序列构件

[0267] 本发明的抗体不仅可以直接重组生产,而且可以作为与异源多肽的融合多肽,所述异源多肽优选是成熟蛋白质或多肽的N-末端处的信号序列或具有特异性切割位点的其它多肽。所选择的异源信号序列优选是受到宿主细胞识别并加工(例如受到信号肽酶切割)的。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,所述信号序列用例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、1pp或热稳定肠毒素II前导序列的原核信号序列取代。为了酵母分泌,天然信号序列可以用例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列(包括糖酵母属和克鲁维氏酵母属 α 因子前导序列)、酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母葡萄糖淀粉酶前导序列、或WO 90/13646中记载的信号取代。在哺乳动物细胞表达中,可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹gD信号。

[0268] (b) 复制起点

[0269] 表达和克隆载体都包含能够使载体在一种或多种所选择的宿主细胞中复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,这种序列是能够使载体不依赖于宿主染色体DNA而复制的序列,包括复制起点或自主复制序列。众所周知多种细菌、酵母和病毒的此类序列。来自质粒pBR322的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适合于酵母,而各种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。一般而言,哺乳动物表达载体不需要复制起点构件(SV40起点的使用通常可能只是因为它包含早期启动子)。

[0270] (c) 选择基因构件

[0271] 表达和克隆载体可包含选择基因,也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a) 赋予抗生素或其它毒素抗性,例如氨基青霉素、新霉素、甲氨蝶呤、或四环素;(b) 补足营养缺陷;或(c) 提供不能由复合培养基获得的关键营养物,例如编码芽孢杆菌D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0272] 选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质,因而幸免于选择方案。此类显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0273] 适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个例子是能够鉴定有能力摄取抗体编码核酸的细胞的选择标志,诸如DHFR、谷氨酰胺合酶(GS)、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II优选灵

长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0274] 例如,通过将转化子在含有甲氨蝶呤(Mtx)(DHFR的一种竞争性拮抗剂)的培养基中进行培养来鉴定经DHFR基因转化的细胞。在这些条件下,DHFR基因与任何其它共转化的核酸一起扩增。可使用内源DHFR活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(例如ATCC CRL-9096)。

[0275] 或者,通过将转化子在含有L-甲硫氨酸亚砷亚胺(Msx)(L-methionine sulfoximine)(GS的一种抑制剂)的培养基中进行培养来鉴定经GS基因转化的细胞。在这些条件下,GS基因与任何其它共转化的核酸一起扩增。可以与上文描述的DHFR选择/扩增系统组合地使用GS选择/扩增系统。

[0276] 或者,可以通过在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷抗生素例如卡那霉素、新霉素、或G418的培养基中的细胞生长来选择经编码感兴趣抗体、野生型DHFR基因、和另一种选择标志诸如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)的DNA序列转化或共转化的宿主细胞(特别是包含内源DHFR的野生型宿主)。参阅美国专利4,965,199。

[0277] 适用于酵母的选择基因因为存在于酵母质粒YRp7中的trp1基因(Stinchcomb et al.,Nature 282:39(1979))。trp1基因因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株,例如ATCC No.44076或PEP4-1提供了选择标志。Jones,Genetics 85:12(1977)。酵母宿主细胞基因组中存在trp1损害随之提供了用于通过在不存在色氨酸下生长来检测转化的有效环境。类似的,用携带Leu2基因的已知质粒补足Leu2缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)。

[0278] 此外,衍生自1.6 μ m环状质粒pKD1的载体可用于转化克鲁维氏酵母属酵母。或者,报导了用于在乳酸克鲁维氏酵母中大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。Van den Berg,Bio/Technology 8:135(1990)。还披露了适用于通过克鲁维氏酵母属的工业菌株分泌成熟重组人血清清蛋白的稳定多拷贝表达载体。Fleer et al.,Bio/Technology 9:968-975(1991)。

[0279] (d) 启动子构件

[0280] 表达和克隆载体一般包含受到宿主生物体识别的启动子,而且它与编码抗体的核酸可操作连接。适用于原核宿主的启动子包括phoA启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶启动子、色氨酸(trp)启动子系统、和杂合启动子诸如tac启动子。然而,其它已知的细菌启动子也是合适的。用于细菌系统的启动子还将包含与编码抗体的DNA可操作连接的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

[0281] 已知真核细胞的启动子序列。事实上,所有真核基因都具有富含AT区,它位于起始转录的位点上游大约25至30个碱基处。在许多基因的转录起点上游70至80个碱基处找到的另一种序列是CNCAAT区,其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'端是AATAAA序列,它可能是向编码序列的3'端添加聚腺苷酸尾的信号。所有这些序列合适地插入真核表达载体。

[0282] 适用于酵母宿主的启动子序列的例子包括3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子,诸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0283] 作为具有通过生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子

是醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步记载于EP 73,657。酵母增强子也可以有利的与酵母启动子一起使用。

[0284] 抗体在哺乳动物宿主细胞中自载体的转录可通过例如从病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒、猿猴病毒40(SV40)基因组,或从异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,及从热休克启动子获得的启动子来控制,倘若此类启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0285] 方便的以SV40限制性片段的形式获得SV40病毒的早期和晚期启动子,该片段还包含SV40病毒复制起点。方便的以HindIII E限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利No.4,419,446中披露了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。美国专利No.4,601,978中记载了该系统的一种改良。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素cDNA还可参见Reyes et al., Nature 297:598-601(1982)。或者,可以使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0286] (e) 增强子元件构件

[0287] 常常通过将增强子序列插入载体来提高高等真核细胞对编码本发明抗体的DNA的转录。现在知道来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而,通常使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括SV40复制起点晚期一侧的增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见Yaniv, Nature 297:17-18(1982)。可以将增强子剪接到载体中,位于抗体编码序列的5'或3'位置,但是优选位于启动子的5'位点。

[0288] (f) 转录终止构件

[0289] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还将包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可以从真核或病毒DNA或cDNA非翻译区的5'端和偶尔的3'端获得。这些区域包含在编码抗体的mRNA的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见WO 94/11026及其中披露的表达载体。

[0290] (g) 宿主细胞的选择和转化

[0291] 适于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞是上文描述的原核生物、酵母或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科,诸如埃希氏菌属(*Escherichia*)例如大肠埃希氏菌或大肠杆菌(*E. coli*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、以及芽孢杆菌属(*Bacilli*)诸如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) (例如1989年4月12日公布的DD 266,710中披露的地衣芽孢杆菌41P)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)诸如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、和链霉菌属

(*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294 (ATCC31,446),尽管其它菌株诸如大肠杆菌B、大肠杆菌X1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌W3110 (ATCC 27,325) 也是合适的。这些例子是例示性的,而不是限制性的。

[0292] 可以在细菌中生产全长抗体、抗体融合蛋白、和抗体片段,特别是在不需要糖基化和Fc效应器功能时,诸如在将治疗性抗体偶联至自身在肿瘤细胞破坏方面显示出效力的细胞毒剂(例如毒素)时。全长抗体在循环中具有较长的半衰期。大肠杆菌中的生成是较快的且较合算的。对于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如U.S.5,648,237 (Carter et al.),U.S.5,789,199 (Joly et al.),U.S.5,840,523 (Simmons et al.),其描述了使表达和分泌优化的翻译起始区(TIR)和信号序列。还可参见Charlton,Methods in Molecular Biology,卷248 (B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),pp.245-254,其描述了在大肠杆菌中表达抗体片段。表达后,可以在可溶性级分中自大肠杆菌细胞浆液分离抗体,并可以通过例如蛋白A或G柱(取决于同种型)来纯化抗体。可以实施最终的纯化,其类似于用于纯化在例如CHO细胞中表达的抗体的工艺。

[0293] 在原核生物以外,真核微生物(诸如丝状真菌或酵母)也是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。啤酒糖酵母或酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常用的面包酵母在最常用的低等真核宿主微生物之中。然而,通常可获得许多其它属、种和菌株且可用于本发明,诸如粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主,诸如例如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母(*K.wickeramii*) (ATCC 24,178)、*K.waltii* (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)和马克思克鲁维酵母(*K.marxianus*);亚罗酵母属(*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母属(*Candida*);瑞氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*),诸如 *Schwanniomyces occidentalis*;和丝状真菌,诸如例如脉孢菌属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolyocladium*)、和曲霉属(*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉(*A.nidulans*) 和黑曲霉(*A.niger*)。关于讨论酵母和丝状真菌用于生产治疗性蛋白质的用途的综述参见例如Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414 (2004)。

[0294] 可选择如下的某些真菌和酵母株,其中糖基化途径已经“人源化”,导致具有部分或完全人的糖基化样式的抗体的生成。参见例如Li et al.,Nat.Biotech.24:210-215 (2006) (记载了巴斯德毕赤氏酵母中糖基化途径的人源化);及Gerngross et al.,见上文。

[0295] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞,它们来自诸如草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕(*Bombyx mori*) 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染,例如苜蓿尺蠖 *Autographa californica* NPV的L-1变体和家蚕 *Bombyx mori* NPV的Bm-5株,而且此类病毒可依照本发明用作本文中的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。

[0296] 还可利用棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、浮萍 (*Lemnaceae*)、苜蓿

(*M. truncatula*)、和烟草的植物细胞培养物作为宿主。参见例如美国专利No.5,959,177;6,040,498;6,420,548;7,125,978;和6,417,429(描述用于在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0297] 可使用脊椎动物细胞作为宿主,而且培养(组织培养)中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规规程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子是经SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾系(293或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的293细胞,Graham et al.,*J.Gen Virol.*36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);小鼠塞托利(*sertoli*)细胞(TM4,Mather,*Biol.Reprod.*23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1,ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);牛鼠(*buffalo rat*)肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳瘤(MMT 060562,ATCC CCL 51);TRI细胞(Mather et al.,*Annals N.Y.Acad.Sci.*383:44-68(1982));MRC5细胞;FS4细胞;和人肝瘤系(Hep G2)。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞细胞系,诸如NS0和Sp2/0。关于适合于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参阅例如Yazaki and Wu,*Methods in Molecular Biology*,卷248(B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),pp.255-268。

[0298] 用上文所述用于生产抗体的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当更改的常规营养培养基中进行培养。

[0299] (h) 培养宿主细胞

[0300] 可以在多种培养基中培养用于生产本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如Ham氏F10(Sigma)、极限必需培养基(MEM,Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、和Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基(DMEM,Sigma)适于培养宿主细胞。另外,可以使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基:Ham et al.,*Meth.Enz.*58:44(1979);Barnes et al.,*Anal.Biochem.*102:255(1980);美国专利No.4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利Re.30,985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(诸如HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如GENTAMYCIN™药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适宜浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件(诸如温度、pH等)就是先前为表达而选择用于宿主细胞的,这对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0301] (xi) 抗体的纯化

[0302] 在使用重组技术时,可以在细胞内、在周质空间中生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,通过例如离心或超滤除去宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter et al.,*Bio/Technology*10:163-167(1992)记载了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的规程。简单的说,在存在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)时使细胞糊融化约30分钟。可通过离心除去细胞碎片。如果将抗体分泌到培养基中,那么一般首先使用商品化蛋白质浓缩滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单

元浓缩来自此类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括蛋白酶抑制剂诸如PMSF来抑制蛋白水解,而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

[0303] 可以使用例如羟磷灰石层析、疏水相互作用层析、凝胶电泳、透析和亲和层析来纯化由细胞制备的抗体组合物,其中亲和层析是优选的纯化步骤之一。蛋白A作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc区的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2或 γ 4重链的抗体(Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。蛋白G推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3(Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能够获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含 C_H3 结构域,则可使用Bakerbond ABX™树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅土上的层析、肝素SEPHAROSE™上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀。

[0304] 一般而言,用于制备供研究、测试、和临床中使用的抗体的各种方法学是本领域完善建立的,与上文所述方法学一致,和/或是本领域技术人员认为适合于特定的感兴趣抗体的。

[0305] D. 选择生物学活性抗体

[0306] 可对如上所述生成的抗体进行一种或多种“生物学活性”测定法以选择从治疗观点看具有有益特性的抗体。可对抗体筛选其结合生成它所针对的抗原的能力。例如,抗VEGF抗体,如下文实施例所示,可在检测结合VEGF的能力的测定法中评估抗体的抗原结合特性。

[0307] 在另一个实施方案中,可通过例如饱和结合;ELISA;和/或竞争测定法(例如RIA)来测定抗体的亲和力。

[0308] 还有,可对抗体进行其它生物学活性测定法,例如为了评估它作为治疗剂的有效性。此类测定法是本领域已知的且依赖于抗体的靶抗原和预定用途。

[0309] 为了筛选结合感兴趣抗原上的特定表位的抗体(例如那些阻断例如抗VEGF抗体结合VEGF的),可实施常规交叉阻断测定法,诸如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow和David Lane (1988)中记载的。或者,可实施表位作图例如如Champe et al., J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)所述来测定抗体是否结合感兴趣表位。

[0310] 在本发明的另一个实施方案中,提供制品,其包含装有本发明含水药物配制剂的容器,而且任选提供它的使用说明。合适的容器包括例如瓶、管形瓶和注射器。容器可用各种材料制成,诸如玻璃或塑料。一种例示性的容器为3-20cc一次使用的玻璃管形瓶。或者,对于多剂配制剂,容器可以是3-100cc玻璃管形瓶。容器装有配制剂,而且该容器上或关联的标签可指示使用说明。制品可进一步包括从商业和用户立场看想要的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头、注射器、和印有使用说明的包装插页。

[0311] 通过参考下述实施例,会更加全面地理解本发明。然而,它们不应解释为限制本发明的范围。通过述及将所有文献和专利引用收入本文。

[0312] 认为本说明书足以使得本领域技术人员实施本发明。根据上述描述,在本文所示

和所述之外对本发明的各种更改对本领域技术人员会变得显然,且落在所附权利要求的范围之内。通过述及将本文中引用的所有出版物、专利、和专利申请完整收入本文,用于所有目的。

实施例

[0313] 要理解,本文中描述的实施例和实施方案只是出于例示目的,而且根据它们,本领域技术人员会想到各种变更和变化,而且它们被包括在本申请的精神和范围及所附权利要求的范围内。

[0314] 实施例1:稳定的抗VEGF抗体液体配制剂

[0315] 这个例子描述稳定的液体配制剂的开发和稳定性测试,该稳定的液体配制剂以约20mg/mL-200mg/mL的范围中的蛋白质浓度在包含组氨酸、精氨酸、乙酸盐、或氯化钠的多种液体配制剂中包含抗VEGF抗体。将1mL每种配制剂在3cc玻璃管形瓶中保存于40°C并于1、2、和4周时评估稳定性。通过数种测定法来监测抗VEGF的稳定性,包括UV(用于浓度和浊度)、大小排阻层析(SEC)(用于大小变体分析)、成像毛细管等电聚焦(i cIEF)(用于电荷变体分析)、CE-SDS(用于大小分布)和结合测定法(用于活性)。4周的稳定性测试后,我们的结果指示抗VEGF在200mM精氨酸乙酸盐、150mM氯化钠、0.04%PS20、pH 5.2中是稳定的。

[0316] 在多种包含组氨酸、氯化钠、精氨酸、和乙酸盐的液体配制剂中研究了抗VEGF的稳定性(例如聚集物形成、粘度、等)。通过数种测定法来监测抗VEGF的稳定性,包括大小排阻层析(SEC)(用于聚集物形成分析)。我们的结果指示抗VEGF在含有精氨酸的缓冲液中于约pH 5.2是稳定的。

[0317] 使用Slide-a-Lyzer®盒通过透析将抗VEGF配制入不同缓冲液以实现表1所列终浓度。用0.22µmSteriflip®滤器单元将每种配制剂无菌过滤并无菌填充入经高压灭菌的管形瓶,塞上塞子,并密封。将样品放置于2-8°C、25°C、和40°C,并在选定温度进行稳定性研究。

[0318] 表1:配制剂

[0319] 配制剂

A	51 mM 磷酸钠, 159 mM 海藻糖, 0.04% PS20, pH 6.2
B	200 mM 精氨酸乙酸盐, 0.04% PS20, pH 5.2
[0320]	C 20 mM 乙酸钠, 240 mM 蔗糖, 0.04% PS20, pH 5.2
D	20 mM 组氨酸氯化物, 200 mM 精氨酸氯化物, 0.04% PS20, pH 5.2

[0321] 方法

[0322] pH:于环境温度在1.5ml Eppendorf管中放置200µL体积的每种样品并使用配备有Ross®半微量电极的Thermo Orion pH计测量它们的pH。使用pH4.0、5.0和7.0的Thermo Orion缓冲液标准校准pH计。

[0323] 粘度:使用带设定为0.049mm高度的25mm椎体(CP 25-1)的Anton Paar Physica MCR300流变仪测量剪切粘度。于25°C将75µL每种样品加载到Peltier板上,并以恒定剪切率1000 1/s每100s间隔测量10次。

[0324] 大小排阻-交换层析(SEC):实施大小排阻层析来定量总聚集物水平(注射原液)和

缓慢解离聚集物水平(注射稀释液)。稀释液注射用流动相缓冲液(0.20M磷酸钾、0.25M氯化钾、pH 6.2)稀释至0.5mg/mL。将所有样品于30℃温育24小时,之后分析。使用Agilent 1100HPLC系统将10μL每种原液样品和100μL每种稀释液样品注射到TSK G3000SWXL, 7.8X 300mm柱(TOSOHAAS, part no.08541)上。将自动采样器保持于30℃,而将柱保持于环境温度。流速为0.5mL/min,且每个样品的总运行时间为30分钟。使用HP Chemstation用280nm吸光度分析数据。

[0325] 离子交换层析(IEX):实施离子交换层析来定量羧肽酶B(CpB)消化样品中的带电荷变体。将样品用溶剂A(20mM N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙磺酸(ACES)缓冲液,pH 6.5)稀释至1mg/mL,用1%w/w添加1mg/mL CpB处理,并于37℃温育20分钟。然后使用Agilent 1100HPLC系统将50μL每种样品注射到Dionex ProPac WCX-10, 4.6X 250mm柱上。自动采样器温度保持于2-8℃,而柱保持于40℃。流速为0.5mL/min,在90分钟里使用溶剂A和溶剂B(含200mM氯化钠的溶剂A),如测试规程中所列。使用HP Chemstation用280nm样品吸光度分析数据。

[0326] 浊度测定法:为了监测浊度,使用Agilent 8453UV-VIS分光光度计于350nm测量每种配制剂的光密度。不稀释就分析所有样品,使用1cm光路长度石英杯。

[0327] -20℃和冻融稳定性研究:将配制剂A-D无菌装填入316L不锈钢迷你罐(15mL/迷你罐)。将所有样品于-20℃保持不同量的时间(例如24、48、72、或更多小时;4、5、6、7、或更多天;2、3、4、5、6、7、8、或更多周;3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或更多月),并在层流通风橱下持续无菌取样。另外,将配制剂A-D装填入6cc玻璃管形瓶并保存于-20℃。对每个管形瓶进行五次冻融循环,并使用SEC、IEC和浊度测定法分析。冻融循环要求于-20℃保存至少24小时,接着于5℃保存至少24小时。

[0328] 结果和讨论

[0329] 此研究调查不同浓度的抗VEGF在基于精氨酸的配制剂中的稳定性(例如聚集物形成、粘度、化学稳定性、等)。使用SEC和IEC来监测加压和加速的保存条件下抗VEGF的稳定性。测量抗VEGF的聚集和粘度,并列于下文表2及示于图2和4。

[0330] 表2:所研究的配制剂的物理特性

[0331]	配制剂	[蛋白质](mg/ml)	%总聚集物	粘度(cP)

[0332]

A	25	7	
A	30	8	
A	100	10	
A	150	13	
B	20	N/D	1.3
B	50	2.6	1.9
B	100	3.8	4.2
B	110	N/D	4.7
B	125	N/D	6.1
B	150	N/D	9.5
C	20	N/D	1.6
C	50	3	2.3
C	100	5.3	5.7
C	125	N/D	12.4
C	150	N/D	23.5
C	175	N/D	52
D	20	N/D	1.3
D	50	2.1	1.8
D	100	3.4	4.3
D	125	N/D	6
D	150	N/D	11.3
D	175	N/D	17.7

[0333] 于40℃的所有配制剂的聚集:测量于40℃保存0、1、2、和4周后每种抗VEGF配制剂中形成的总聚集物和二聚体的量,并列于下文表3、4、和5及示于图1和3。

[0334] 表3:于40℃保存后的总聚集物

[0335]

样品	%总聚集物 4周
A	10.3
B	5

[0336]	C	7.1
	D	10.8

[0337] 表4:于40℃保存后的总聚集物

	%总聚集物	%总聚集物	%总聚集物	%总聚集物
样品	0周	1周	2周	4周
[0338] B	3.9	4.7	5.3	6.1
C	5.4	6.8	8.3	8.1
D	3.4	5.2	8.4	13.1

[0339] 表5:于40℃保存后的二聚体

	%二聚体	%二聚体	%二聚体	%二聚体
样品	0周	1周	2周	4周
[0340] B	3.3	3.9	4.4	5.0
C	4.7	6.0	7.4	7.1
D	2.8	4.2	6.7	10.8

[0341] 于25℃的配制剂的聚集:测量于25℃保存0、2、4、和8周后每种抗VEGF配制剂(100mg/ml)中形成的总聚集物和二聚体的量,并列于下文表6。

[0342] 表6:于25℃保存后的总聚集物

	%总聚集物	%总聚集物	%总聚集物	%总聚集物
样品	0周	2周	4周	8周
[0343] B	3.9	4.6	4.3	3.4
C	5.4	6.6	6.6	4.8
D	3.4	5.1	6.4	6.1

[0344] 于2-8℃的配制剂的聚集:测量于2-8℃保存0和4周后每种抗VEGF配制剂(100mg/ml)中形成的聚集物和二聚体的量,并列于下文表7。

[0345] 表7:于2-8℃保存后的总聚集物和二聚体

样品	%总聚集物	%总聚集物	%二聚体	%二聚体
	0周	4周	0周	4周
[0346] B	3.9	3.8	3.3	3.2
C	5.4	5.7	4.7	5.1
D	3.4	3.5	2.8	2.9

[0347] 于40℃于多种精氨酸浓度的聚集:测量于多种精氨酸乙酸盐浓度每种抗VEGF配制剂中形成的总聚集物的量,并列于下文表8。

[0348] 表8:于多种精氨酸乙酸盐浓度的总聚集物

精氨酸乙酸盐浓度 (mM)	%总聚集物
25	5.2
[0349] 50	4.8
100	4.4
200	4.2

[0350] 赋形剂和离子强度的影响:调查了不同赋形剂对抗VEGF的稳定性的影响。所探索的赋形剂的列表包括磷酸盐、精氨酸乙酸盐、乙酸钠、和组氨酸氯化物。我们的结果显示了含有精氨酸氯化物 (arginine chloride) 和组氨酸氯化物 (histidine chloride) 的配制剂比所有其它配制剂聚集更快。

[0351] 在多种缓冲液条件中评估了抗VEGF的稳定性。自研究获得的数据显示抗VEGF在介于pH 4.0和pH 6.0之间的精氨酸乙酸盐缓冲液中更加稳定。自配制剂筛选研究获得的数据显示抗VEGF在pH5.2的200mM精氨酸乙酸盐、0.04%PS20中在100mg/mL蛋白质浓度是稳定的且具有降低的聚集物和二聚体形成。

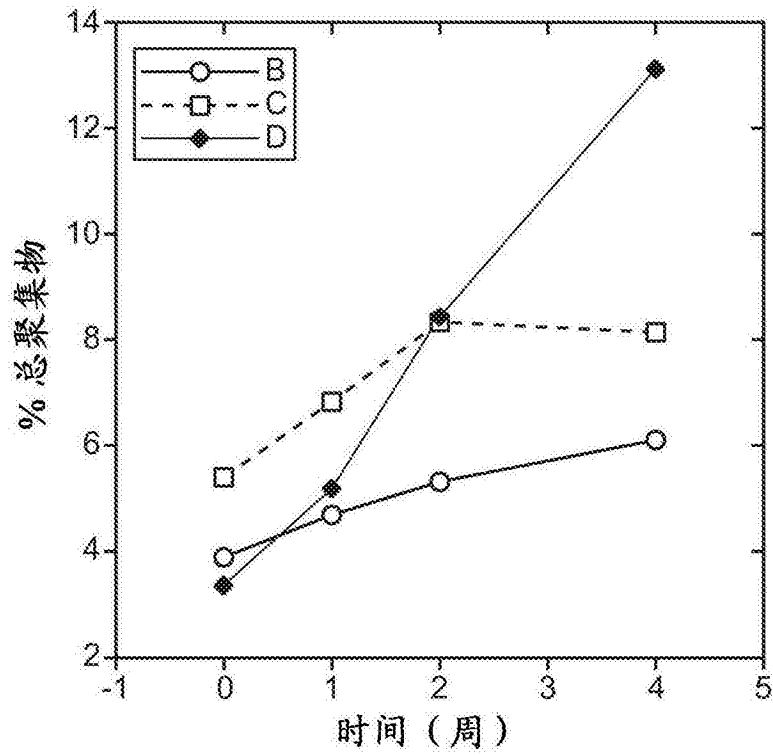


图1

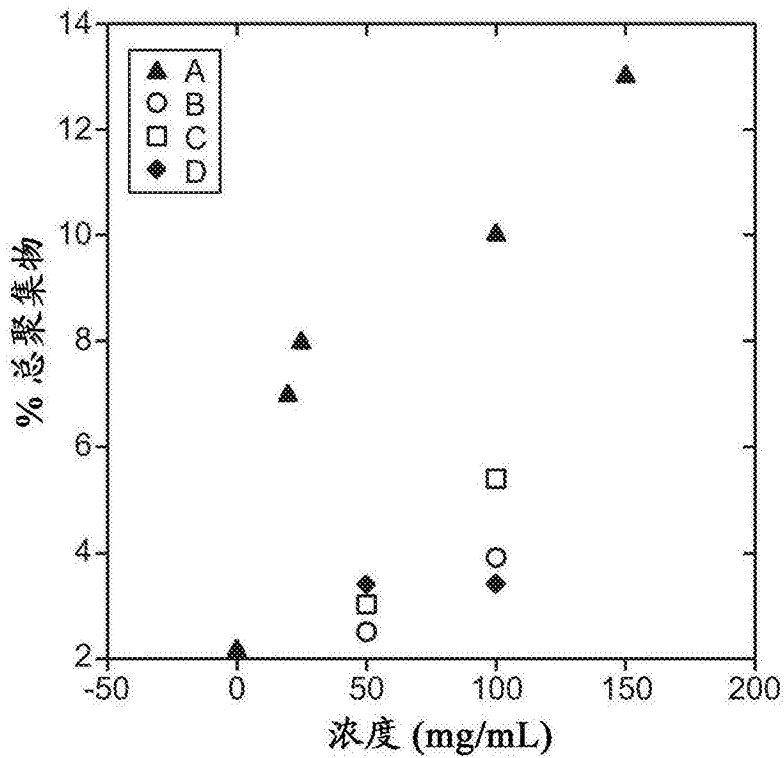


图2

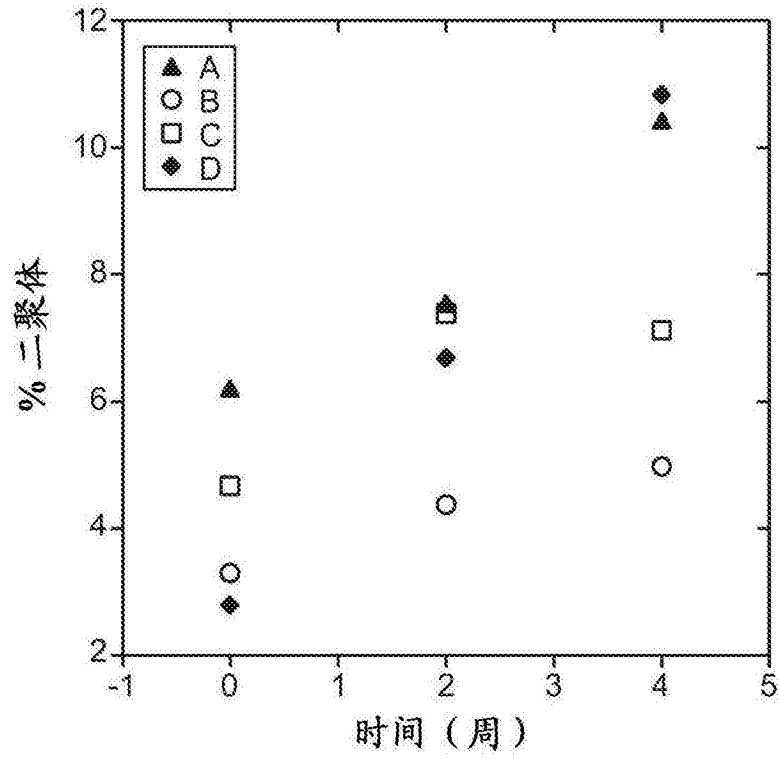


图3

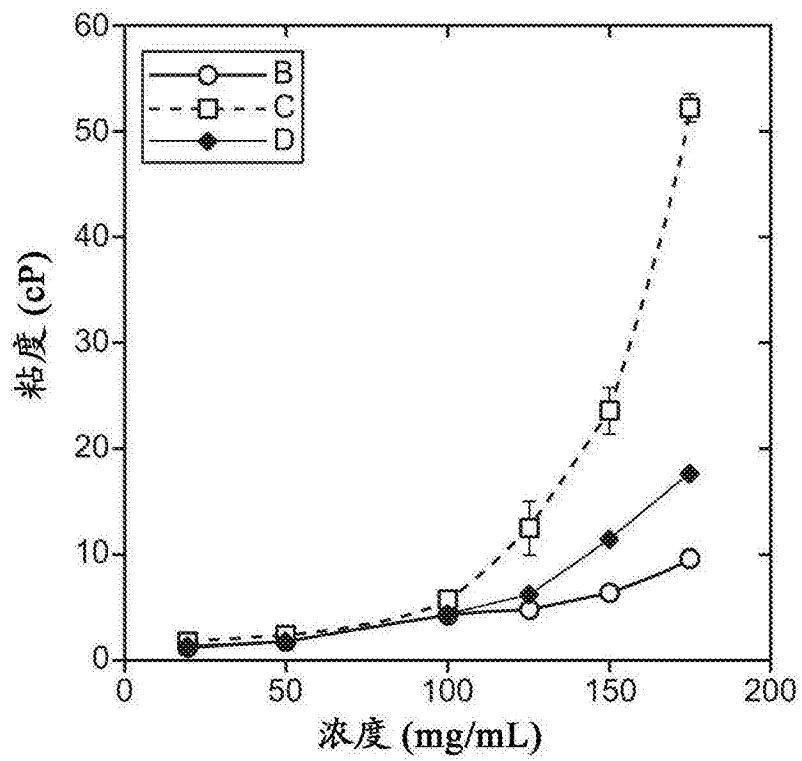


图4