



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109498565 B

(45) 授权公告日 2021.06.29

(21) 申请号 201811607786.8

A61K 47/02 (2006.01)

(22) 申请日 2018.12.27

A61K 47/26 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/395 (2006.01)

申请公布号 CN 109498565 A

A61P 35/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.03.22

A61P 31/00 (2006.01)

(73) 专利权人 兴盟生物医药(苏州)有限公司

A61P 37/00 (2006.01)

地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区

A61P 37/06 (2006.01)

桑田街218号生物产业园5号楼

(56) 对比文件

(72) 发明人 靳志刚 谭莹

CN 106390115 A, 2017.02.15

CN 107198773 A, 2017.09.26

(74) 专利代理机构 北京精金石知识产权代理有限公司 11470

WO 2018028383 A1, 2018.02.15

审查员 李友

代理人 张黎

(51) Int. Cl.

A61K 9/08 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

A61K 47/12 (2006.01)

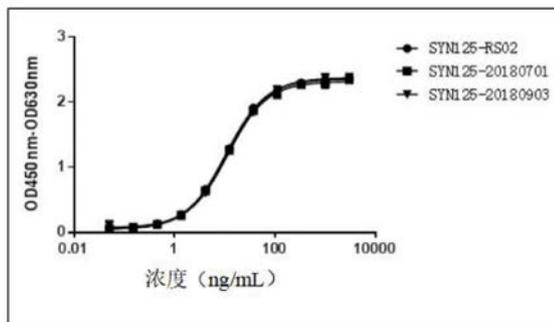
序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

一种稳定的抗PD-1抗体制剂及其用途

(57) 摘要

本发明属于抗体制剂领域,尤其涉及一种稳定的抗PD-1抗体制剂及其用途。具体的,所述制剂包括柠檬酸盐、氯化钠和聚山梨酯,且pH为5.0-8.0。本发明的制剂与现有上市抗PD-1抗体制剂产品或者专利保护的抗PD-1抗体制剂相比,不仅能有效降低抗PD-1抗体的化学降解反应速率,提高抗体的化学稳定性,延长产品的货架期,而且可消除或减轻患者的注射部位副反应,提高病人的用药舒适度。



1. 一种稳定的抗PD-1抗体制剂,其特征在于,所述制剂包括抗PD-1抗体、柠檬酸盐缓冲液、氯化钠、聚山梨酯;

所述抗PD-1抗体由重链和轻链组成,所述重链的可变区包括有氨基酸序列SEQ ID NO:1-3所示的CDR,所述轻链的可变区包括有氨基酸序列SEQ ID NO:4-6所示的CDR;

所述聚山梨酯为聚山梨酯-80或聚山梨酯-20;

所述抗PD-1抗体的浓度为5-150 mg/mL,所述柠檬酸盐缓冲液的浓度为5-40 mM,所述氯化钠的浓度为20-150 mM,所述聚山梨酯-80或聚山梨酯-20的浓度为0.005%-0.05%w/v,且pH为6.0-6.5。

2. 根据权利要求1所述的抗PD-1抗体制剂,其特征在于,所述抗PD-1抗体的浓度为5-50 mg/mL,所述柠檬酸盐缓冲液的浓度为5-30 mM,所述氯化钠的浓度为50-120 mM,所述聚山梨酯-80的浓度为0.005%-0.03%w/v。

3. 根据权利要求2所述的抗PD-1抗体制剂,其特征在于,所述重链的氨基酸序列为SEQ ID NO:7所示,所述轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO:8所示。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的抗PD-1抗体制剂,其特征在于,所述柠檬酸盐缓冲液采用一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠制备。

5. 一种权利要求1-3任一项所述的抗PD-1抗体制剂的用途,其特征在于,所述制剂用于制备静脉注射药物,或用于制备皮下注射药物。

6. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1-3任一项所述的抗PD-1抗体制剂。

一种稳定的抗PD-1抗体制剂及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于抗体制剂领域,尤其涉及一种稳定的抗PD-1抗体制剂及其用途。

背景技术

[0002] PD-1(Programming death 1,程序性死亡受体1),是人体内一种重要的免疫抑制因子,为免疫球蛋白,是由268个氨基酸组成的膜蛋白。其最早是从凋亡的小鼠T细胞杂交瘤2B4.11克隆出来的。以抗PD-1为靶点治疗的免疫调节剂,包括抗PD-1的单克隆抗体(Anti-PD-1 monoclonal antibody),可以阻断PD-1及其配体PD-L1和PD-L2间的相互作用,对抗肿瘤、抗感染、抗自身免疫性疾病及器官移植存活等均具有重要的意义。

[0003] 临床上治疗疾病的抗体药物在患者身上使用之前,必须要有合适的条件储存,以便保证产品质量的稳定可靠。因此,储存相应抗体药物的保护剂的研制开发就尤显重要。同样治疗各样肿瘤和传染病的抗PD-1抗体也需要有稳定的保护剂的支持。且研制的保护剂最好可以提供一个相对较长的储存效期,使其在存储和运输过程中质量稳定,而且最好适用于皮下注射时的高浓度要求,也适用于静脉注射时的较低浓度的条件需求。

[0004] 目前抗PD-1抗体的主要上市产品有:1)来自美国Merck(默沙东)的K药Keytruda(Pembrolizumab,健痊得/派姆),规格为100mg/4mL(25mg/mL),每1mL制剂中含有的保护剂为1.55mg L-组氨酸、0.2mg聚山梨酯-80、70mg蔗糖,pH 5.5;2)来自美国Bristol-Myers Squibb(施贵宝)的O药Opdivo(Nivololumab,欧狄沃/纳武利尤),规格为40mg/4mL(10mg/mL)和100mg/10mL(10mg/mL)。每1mL制剂中含有的保护剂为30mg甘露醇、0.008mg喷替酸、0.2mg聚山梨醇-80、2.92mg氯化钠、5.88mg柠檬酸钠二水合物,pH 6.0。

[0005] 本申请的一部分发明人发现,目前上市的抗PD-1抗体中的保护剂成分相对复杂,含有对被保护抗体没有明显益处的成分,且用药时常引起病人注射部位疼痛加剧等副反应。在制剂加速稳定性研究中,对抗PD-1抗体的稳定保护效果较差,导致抗PD-1抗体制品在储存、运输(尤其是高温条件下)过程中稳定性保护效果降低,间接影响抗PD-1抗体制剂产品的质量。因此有必要开发一种能提高抗PD-1抗体储存、运输过程中的稳定性、且能够减轻或消除患者的注射部位副反应的新型抗PD-1抗体制剂。

发明内容

[0006] 本发明针对现有技术存在的问题,提供一种成分简单,效果良好,成分稳定的抗体制剂。本发明提供的抗体制剂包含抗体、柠檬酸盐、氯化钠和聚山梨酯,且pH为5.0-8.0,本发明提供的抗体制剂能使抗体在同样的保存条件下更加稳定,且能减轻或消除患者注射部位的副反应。

[0007] 如本文所用,除非特别指出,则“约”是指在±10%范围内。

[0008] 本发明第一方面提供了一种抗体制剂,其包含抗体、柠檬酸盐缓冲液、氯化钠、聚山梨酯,且pH为5.0-8.0;

[0009] 进一步的,所述聚山梨酯为聚山梨酯-80或聚山梨酯-20;

[0010] 进一步的,所述抗体优选为抗PD-1抗体;

[0011] 进一步的,所述抗PD-1抗体由重链和轻链组成,所述重链的可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:1-3所示的CDR,所述轻链的可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:4-6所示的CDR;

[0012] 进一步的,所述抗PD-1抗体重链的氨基酸序列为SEQ ID NO:7所示,所述抗PD-1抗体轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO:8所示;

[0013] 更进一步的,所述抗PD-1抗体为专利W02017/087599A1所述的抗PD-1抗体及其相关抗原结合片段。

[0014] 在一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约5-150mg/mL抗PD-1抗体的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明提供了包含浓度为约5-50mg/mL抗PD-1抗体的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明提供了包含浓度为约20-30mg/mL抗PD-1抗体的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明提供了包含浓度为约20mg/mL抗PD-1抗体的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明提供了包含浓度为5mg/mL抗PD-1抗体的抗体制剂。

[0015] 在一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约5-40mM柠檬酸盐的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约5-30mM柠檬酸盐的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约10-20mM柠檬酸盐的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约15-25mM柠檬酸盐的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约20mM柠檬酸盐的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为20mM柠檬酸盐的抗体制剂。

[0016] 在一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约20-200mM氯化钠的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约20-150mM氯化钠的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约50-120mM氯化钠的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约50mM或约100mM或约150mM氯化钠的抗体制剂;在另一项实施例中,本发明还提供了包含浓度为100mM氯化钠的抗体制剂。

[0017] 在一项实施例中,本发明还提供了包含浓度为约0.005%-0.05%的聚山梨酯-80或聚山梨酯-20的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约0.005%-0.03%的聚山梨酯-80或聚山梨酯-20的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约0.01%-0.03%的聚山梨酯-80或聚山梨酯-20的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约0.01%-0.02%的聚山梨酯-80或聚山梨酯-20的抗体制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为约0.01%的聚山梨酯-80或聚山梨酯-20的制剂;在另一项实施方案中,本发明还提供了包含浓度为0.01%的聚山梨酯-80或聚山梨酯-20的抗体制剂。

[0018] 在一项实施例中,本发明还提供了包括约5.0-8.0的pH范围的抗体制剂;在另一项实施例中,本发明还提供了包括5.0-8.0的pH范围的抗体制剂;在另一项实施例中,本发明还提供了包括约5.0或约5.5或约6.0或约6.5或约7.0或约7.5或约8.0的抗体制剂;在另一项实施例中,本发明还提供了包括5.0或5.5或6.0或6.5或7.0或7.5的抗体制剂。

[0019] 本发明的抗体制剂包含柠檬酸盐缓冲剂;柠檬酸盐缓冲剂可以用柠檬酸、柠檬酸三钠二水合物和柠檬酸一水合物;或者柠檬酸钠二水合物、磷酸氢二钠和柠檬酸来制备;柠檬酸盐缓冲剂也可以用柠檬酸二氢钠、柠檬酸三钠盐或柠檬酸钠水合物来制备;优选的,柠

檬酸缓冲剂采用柠檬酸一水合物和柠檬酸钠二水合物来制备,且所述一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠的浓度(w/v)比例为1:10-1:15;在另一项实施例中,本发明还提供了一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠的比例为1:12(w/v)的实施例。

[0020] 本发明第二方面,提供了一种第一方面所述抗体制剂的用途,所述制剂用于制备静脉注射药物,或用于制备皮下注射药物。

[0021] 本发明第三方面,还提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括本发明第一方面所述的抗体制剂;

[0022] 进一步的,所述试剂盒还包括用于盛装所述抗体制剂的容器;

[0023] 进一步的,所述试剂盒还包括使用说明书。

[0024] 本发明的制剂可采用本领域公知的方法将各种组分按一定的浓度进行组合得到。

[0025] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0026] (1) 本发明提供的PD-1抗体制剂与现有上市抗PD-1产品或者专利保护的抗PD-1抗体产品相比,组分简单,没有螯合稳定剂喷替酸。

[0027] (2) 本发明提供了以柠檬酸盐作为抗体保护剂缓冲体系的PD-1抗体制剂,其在维持抗PD-1抗体的蛋白含量、单体含量、抗体纯度、主峰百分比、等电点特性和体外结合活性、减少蛋白质可见颗粒的形成上优于乙酸盐、组氨酸和磷酸盐缓冲盐体系。

[0028] (3) 本发明开发的PD-1抗体制剂,可以使PD-1抗体无论是正立或者倒立的情况下,在25℃条件下稳定储存3个月,在高温40℃条件下稳定储存2个月。而PD-1试验对照组K药所采用的组氨酸缓冲体系保护剂,在试验结束时呈现出明显的可见颗粒物(蛋白絮凝),相应的主峰含量(异构体转变)也劣于本发明开发的抗PD-1抗体制剂的结果。

[0029] (4) 和现有上市抗PD-1抗体制剂产品或者专利保护的抗PD-1抗体制剂相比,本发明开发的抗体制剂不仅能有效降低抗PD-1抗体的化学降解反应速率,提高抗体的化学稳定性,延长产品的货架期,而且可消除或减轻患者的注射部位副反应,提高病人的用药舒适度。

附图说明

[0030] 图1为实施例9中两批抗体制剂中抗PD-1抗体SYN125结合活性检测结果。

[0031] 图2为实施例9中两批抗体制剂中抗PD-1抗体SYN125阻断活性检测结果。

[0032] 图3为实施例9中两批抗体制剂中抗PD-1抗体SYN125生物学活性检测结果。

具体实施方式

[0033] 下面对本发明的技术方案进行清楚、完整的描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围,以下非限制性实施例可以使本领域的普通技术人员更全面的理解本发明,但不以任何方式限制本发明。下述内容仅仅是对本申请要求保护的范围的示例性说明,本领域技术人员可以根据所公开的内容对本申请的发明作出多种改变,而其也应当属于本申请要求保护的范围之内。

[0034] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所

述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0035] 下面以具体实施例的方式对本发明作进一步的说明。本发明的具体实施例以专利W02017/087599A1所述的抗PD-1抗体为示例,本发明中所使用的抗PD-1抗体SYN125是参照专利W02017/087599A1所述的制备方法制备得到的。其他实验材料均是通过商业渠道得到。

[0036] 以下实施例以及对比例中的抗体制剂均是通过常规方法,将各组分进行混合来制备得到的。其他检测方法操作如下:

[0037] SEC测试方法:抗PD-1抗体纯度的检测按照《中华人民共和国药典》(2010年版,三部)附录III B进行测定,用亲水硅胶提及排阻色谱柱TSK Super SW3000,上样量20-30 μ g,流动相为100mM Na₂HPO₄+100mM Na₂SO₄pH 6.8,流速0.3mL/min,检测波长280&214nm,柱温25 $^{\circ}$ C,用面积归一法计算。

[0038] 设备:美国安捷伦1260高效液相色谱分析仪。

[0039] IEX测试方法:抗PD-1抗体电荷异构体的检测按照《中华人民共和国药典》(2010年版,三部)附录III B进行测定,用Thermo ProPac WCX-10BioLC分析柱,上样量20-30 μ g,流动相A为20mM磷酸盐,pH 6.5;流动相B为20mM磷酸盐+150mM NaCl,pH 6.5,流速1.0ml/min,检测波长280&214nm,柱温40 $^{\circ}$ C,用面积归一法计算。

[0040] 设备:美国安捷伦1260高效液相色谱分析仪。

[0041] 可见颗粒物的检测方法:抗PD-1抗体制剂的可见颗粒物的检测按照USP<788>进行测定。取检测制剂样品100 μ L放置到检测杯中,用紫外分光光度计检测在波长330nm的读值,得到可见颗粒吸收值。

[0042] 蛋白浓度的检测方法:抗PD-1抗体制剂的蛋白浓度的检测按照USP<1057>进行测定。供试品稀释至0.3-0.5mg/mL,充分混匀,离心10000rpm,5分钟,平行重复三管,用紫外分光光度计检测在波长280nm的吸光值并计算蛋白浓度。理论吸光系数为1.55AU \times mL \times mg⁻¹ \times cm⁻¹。每个供试品至少测定三次,取其平均值。

[0043] 其余实验手段均按照常规实验条件进行。

[0044] 实施例1抗体制剂配方1

[0045] 制剂中各组分含量如表1所示:

[0046] 表1抗体制剂

成分	含量
抗PD-1抗体SYN125	5mg/mL
柠檬酸盐	20mM
氯化钠	100mM
聚山梨酯-80	0.01% (w/v)
pH	6.0

[0048] 实施例2抗体制剂配方2

[0049] 制剂中各组分含量如表2所示:

[0050] 表2抗体制剂

成分	含量
抗 PD-1 抗体 SYN125	20 mg/mL
柠檬酸盐	20 mM
氯化钠	100 mM
聚山梨酯-80	0.01% (w/v)

pH	6.0
----	-----

[0053] 实施例3抗体制剂配方3

[0054] 制剂中各组分含量如表1所示：

[0055] 表3抗体制剂

成分	含量
抗PD-1抗体SYN125	45mg/mL
柠檬酸盐	20mM
氯化钠	100mM
聚山梨酯-80	0.01% (w/v)
pH	6.0

[0057] 实施例4抗体制剂配方4

[0058] 制剂中各组分含量如表1所示：

[0059] 表4抗体制剂

成分	含量
抗PD-1抗体SYN125	20mg/mL
柠檬酸盐	10mM
氯化钠	100mM
聚山梨酯-80	0.01% (w/v)
pH	6.0

[0061] 实施例5抗体制剂配方5

[0062] 制剂中各组分含量如表1所示：

[0063] 表5抗体制剂

成分	含量
抗 PD-1 抗体 SYN125	20 mg/mL
柠檬酸盐	20 mM
氯化钠	100 mM

聚山梨酯-80	0.01% (w/v)
pH	6.5

[0066] 实施例6抗体制剂配方6

[0067] 制剂中各组分含量如表1所示：

[0068] 表6抗体制剂

成分	含量
抗PD-1抗体SYN125	20mg/mL
柠檬酸盐	20mM
氯化钠	100mM
聚山梨酯-20	0.01% (w/v)
pH	6.0

[0070] 实施例7抗体制剂配方7

[0071] 制剂中各组分含量如表1所示：

[0072] 表7抗体制剂

成分	含量
抗PD-1抗体SYN125	20mg/mL
柠檬酸盐	20mM
氯化钠	100mM
聚山梨酯-80	0.02% (w/v)
pH	6.0

[0074] 对比例1

[0075] 制剂中各组分含量如表1所示：

[0076] 表8抗体制剂

成分	含量
抗 PD-1 抗体 SYN125	25 mg/mL
组氨酸盐	10 mM
蔗糖	70 mg/mL
聚山梨酯-80	0.02% (w/v)
pH	5.5

[0079] 对比例2

[0080] 制剂中各组分含量如表1所示：

[0081] 表9抗体制剂

成分	含量
抗PD-1抗体SYN125	10mg/mL
甘露醇	30mg/mL
喷替酸	0.008mg/mL
聚山梨酯-80	0.02% (w/v)
氯化钠	2.92mg/mL
二水合柠檬酸钠	5.88mg/mL

pH	6.0
----	-----

[0083] 对比例3

[0084] 制剂中各组分含量如表1所示：

[0085] 表10抗体制剂

成分	含量
抗PD-1抗体SYN125	20mg/mL
组氨酸盐	30mM
氯化钠	100mM
聚山梨酯-80	0.02% (w/v)
pH	6.0

[0087] 其中实施例1-3的区别在于抗PD-1抗体的浓度不同,实施例4中的柠檬酸盐浓度不同,实施例5中的pH与前面的实施例不同,实施例6采用了聚山梨酯-20,实施例7中聚山梨酯-80的含量与上述实施例不同,对比例1和2是已上市的抗PD-1抗体中保护剂的配方,对比例3为本发明范围之外的其他抗体制剂配方。

[0088] 研究了以上实施例和对比例在40℃±2℃加速稳定性试验条件下,保存4周,抗体的稳定性。通过IEX-HPLC表征抗PD-1抗体SYN125的化学稳定性,以IEX-HPLC主峰下降和酸性组分上升百分比作为判定手段,同时采用SEC-HPLC检测了蛋白纯度,实验结果如表11所示：

[0089] 表11蛋白电荷异构变化结果和蛋白纯度变化结果

Number	蛋白电荷异构变化结果		蛋白纯度变化结果
	IEX 主峰下降百分比 (%)	IEX 酸性组分上升百分比 (%)	SEC 主峰下降百分比 (%)
实施例 1	12.2	11.1	1.4
实施例 2	8.1	8.2	1.0
实施例 3	9.1	10.5	1.2
实施例 4	12.9	8.5	1.0
实施例 5	12.3	12.2	1.3
实施例 6	10.3	10.9	1.0
实施例 7	12	9.5	1.1
对比例 1	22.1	19.8	2.4
对比例 2	24.2	19.9	1.7
对比例 3	20	21	1.9

[0090] 从表11可以看出,和对比例1-3相比,本发明制剂(实施例1-7)中抗体电荷异构变化的IEX主峰下降百分比和IEX酸性组分上升百分比均显著降低,上述实验结果表明:本发明所采用的柠檬酸盐缓冲体系使抗体制剂的化学降解反应速率降低,抗体的稳定性得到了明显提高,因此提高了产品质量的均一性和一致性,有助于延长抗PD-1抗体的货架期。同时

SEC主峰下降百分比的结果表明：本发明所采用的柠檬酸盐缓冲体系能使抗体在相同条件下保持较高的蛋白纯度，从而保持优异产品质量的稳定性。

[0092] 发明人还对各实施例和对比例中的抗体制剂的其他稳定性指标，包括外观、蛋白浓度、浊度均进行了测试比较，结果发现上述实施例中抗体制剂的稳定性指标均优于对比例，该结果表明，本发明范围内的抗体制剂保持了优异的稳定性。

[0093] 此外，和对比例2相比，本发明中的抗体制剂不含螯合稳定剂喷替酸，因此消除了制剂因含有相应螯合剂造成的患者注射部位疼痛加剧的弊病。

[0094] 实施例8抗体制剂中抗PD-1抗体的稳定性研究

[0095] 本发明优选的制剂组合如实施例2所示，对优选的抗体制剂中抗体的稳定性进行检测，数据为以后抗PD-1抗体药品的制备、储存期长短、成品储存器皿的选择提供基础。另外，我们也同时选择对比例1中的抗体制剂作为对照组。

[0096] 以蛋白浓度、可见颗粒物浓度、IEX-HPLC检测的酸峰百分比（酸性组分）和保持的主峰百分比、采用SEC-HPLC检测的高聚物的浓度和抗体蛋白纯度来表征抗体的稳定性。实验结果如表12所示：本发明中优选的抗体制剂，在 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 保存3个月， $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 保存2个月条件下，无论待试的样品是正立（Upright）或倒立放置（Inversed）的，可见颗粒物和蛋白浓度都没有显著的变化。同时，在相同的储存条件下，抗体蛋白纯度、保持的主峰百分比均优于对照组，且酸性组分的量和增加的高聚物的百分比也比对照组少。实验结果表明，本发明所提供的抗体制剂在相同的储存条件下更加稳定。

[0097] 表12保护剂对PD-1抗体的保护和稳定性试验结果

Number	储存条件	时间	蛋白浓度 (mg/mL)	A ₃₃₀	SEC-HPLC (%)		IEX-HPLC (%)	
				可见颗粒物 (%)	高聚物	纯度	酸峰	主峰
[0098] 实验组	2-8°C	T0	20.4	0.07	0.9	99.1	10.7	79.5
	25°C, Upright	3M	20.3	0.07	1.0	98.9	17.9	75.4
	25°C, Inversed	3M	20.2	0.07	1.1	98.8	17.9	74.9
	40°C, Upright	4W	20.1	0.08	1.2	98.7	21.1	64.6
	40°C, Upright	2M	20.2	0.08	1.6	98.2	40.4	56.0
对照组	2-8°C	T0	21.5	0.08	0.8	99.2	9.0	83.1
	25°C, Upright	3M	20.0	0.09	1.4	98.5	21.9	70.5
	25°C, Inversed	3M	20.1	0.10	1.5	98.4	23.2	69.9
	40°C, Upright	4W	20.3	0.10	1.3	98.6	28.2	62.1
	40°C, Upright	2M	20.4	0.14	1.8	98.0	44.3	51.6

[0099] 实施例9：抗体制剂中抗PD-1抗体的活性研究

[0100] (1) 抗体制剂中抗PD-1抗体的结合活性研究

[0101] 进一步研究了抗体制剂中抗PD-1抗体的结合活性，采用实施例2所述的抗体制剂重复制备了两批样品（储存条件为 25°C ，3个月），样品编号分别为SYN125-20180701和SYN125-20180903，研究了这两批样品中抗PD-1抗体SYN125的结合活性。以标准品（标准品为用实施例2所述的抗体制剂制备的SYN125标准参考品，并对其物理、化学、生物特性和蛋白结构等进行了全面的检定，符合现有标准）作为对照，标准品编号为SYN125-RS02，用间接ELISA原理，将PD-1抗原固定于酶标板上与上述样品、标准品进行梯度结合，再结合HRP标记

的二抗,通过TMB显色,其显色的OD值大小与结合的SYN125抗体的量成正比关系,最后利用GraphPad Prism软件拟合出曲线,并得出 EC_{50} 值。实验结果如表13和图1所示:两批抗体制剂样品(SYN125-20180701和SYN125-20180903)与标准品(SYN125-RS02)相比较,其平均比活性分别为:97%和91%,实验结果表明:本发明所提供的抗体制剂中SYN125抗体的结合活性与标准品相当,说明本发明的抗体制剂中的抗PD-1抗体具有良好的与PD-1结合的活性。

[0102] 表13两批SYN125样品结合活性结果

样品名称	实验次数	参比品	样品 EC_{50} (ng/ml)	比活性	平均比活性
		SYN125-RS02 EC_{50} (ng/ml)			
[0103] SYN125-20180701	1	10.70	10.82	99%	97%
	2	11.14	10.85	103%	
	3	10.55	11.98	88%	
SYN125-20180903	1	10.70	11.98	89%	91%
	2	11.14	12.00	93%	
	3	10.55	11.59	91%	

[0104] (2) 抗体制剂中抗PD-1抗体的阻断活性研究

[0105] 同时研究了一定条件下、储存一定时间后抗体制剂中抗PD-1抗体的阻断活性,采用(1)中的两批次样品以及标准品,应用竞争性ELISA原理,将PD-1抗原固定于酶标板上,SYN125抗体与固定浓度的PD-L1抗原梯度混合孵育后,再与固定于板上的PD-1抗原竞争结合,然后结合HRP标记的二抗,通过TMB显色,其显色的OD值大小与游离的PD-L1量成正比关系,最后利用GraphPad Prism软件拟合出曲线,并得出 EC_{50} 值。实验结果如表14和图2所示,实验结果表明:两批抗体制剂样品(SYN125-20180701和SYN125-20180903)与标准品(SYN125-RS02)相比较,其平均比活性分别为:105%和85%,实验结果表明:本发明所提供的抗体制剂中SYN125抗体的阻断活性与标准品相当,说明本发明的抗体制剂中的抗PD-1抗体具有良好的阻断PD-L1的活性。

[0106] 表14 SYN125两批样品阻断活性结果

样品名称	实验次数	参比品	样品 EC_{50} (μ g/mL)	比活性	平均比活性
		SYN125- RS02 EC_{50} (μ g/mL)			
[0107] 实施例 1	1	0.09345	0.09059	103%	105%
	2	0.08653	0.1038	83%	
	3	0.1118	0.08649	129%	
对比例 1	1	0.09345	0.1065	88%	85%
	2	0.08653	0.1194	72%	
	3	0.1118	0.1189	94%	

[0108] (3) 抗体制剂中抗PD-1抗体的生物学活性研究

[0109] 同时研究了一定条件下、储存一定时间后抗体制剂中抗PD-1抗体的生物学活性。采用(1)中的两批次样品以及标准品,实验选取Promega公司一对工程细胞株,PD-1Effector Cells和PD-L1Apc/CHO-K1Cells,当这两株细胞上的PD-1与PD-L1结合时,可抑制TCR信号通路及NFAT-RE介导的发光信号表达。加入SYN125抗体后,SYN125与PD-

1Effector Cells上的PD-1蛋白结合,阻止了细胞抑制机制发动,促进了生物发光信号表达,其发光信号值大小与SYN125抗体量成正比关系,最后利用GraphPad Prism软件拟合出曲线,并得出EC₅₀值。实验结果如表15和图3所示。SYN125抗体两批样品(SYN125-20180701和SYN125-20180903)与参比品(SYN125-RS02)相比较的生物学活性检测结果分别为:76%和87%,说明本发明所提供的抗体制剂中SYN125抗体的生物学活性与标准参比品相当,说明本发明的抗体制剂中的抗PD-1抗体具有良好的结合PD-1的生物学活性。

[0110] 表15 SYN125两批样品生物学活性结果

样品名称	实验次数	参比品	样品 EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	比活性	平均比活性
		SYN125-RS02 EC50($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
SYN125-20180701	1	0.8107	1.032	79%	76%
	2	0.3408	0.4622	74%	
	3	0.5136	0.6863	75%	
SYN125-20180903	1	0.6927	0.9127	76%	87%
	2	0.4579	0.4057	113%	
	3	0.4117	0.5763	71%	

[0113] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 兴盟生物医药(苏州)有限公司
- [0003] <120> 一种稳定的抗PD-1抗体制剂及其用途
- [0004] <130> 20181127
- [0005] <160> 8
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 9
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> Artificial sequence
- [0011] <400> 1
- [0012] Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Thr
- [0013] 1 5
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 5
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> Artificial sequence
- [0018] <400> 2
- [0019] Cys Trp Glu Asp Ser
- [0020] 1 5
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 10
- [0023] <212> PRT
- [0024] <213> Artificial sequence
- [0025] <400> 3
- [0026] Glu Asp Ser Gly Tyr Phe Trp Phe Pro Tyr
- [0027] 1 5 10
- [0028] <210> 4
- [0029] <211> 10
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> Artificial sequence
- [0032] <400> 4
- [0033] Lys Ala Gly Gln Asn Val Asn Tyr Leu Ala
- [0034] 1 5 10
- [0035] <210> 5
- [0036] <211> 7
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> Artificial sequence

[0039] <400> 5
 [0040] Asn Ala Asn Ser Leu Gln Thr
 [0041] 1 5
 [0042] <210> 6
 [0043] <211> 8
 [0044] <212> PRT
 [0045] <213> Artificial sequence
 [0046] <400> 6
 [0047] Gln Gln Tyr Asn Ser Trp Thr Thr
 [0048] 1 5
 [0049] <210> 7
 [0050] <211> 448
 [0051] <212> PRT
 [0052] <213> Artificial sequence
 [0053] <400> 7
 [0054] Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 [0055] 1 5 10 15
 [0056] Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 [0057] 20 25 30
 [0058] Gly Thr Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 [0059] 35 40 45
 [0060] Trp Leu Ala Thr Ile Cys Trp Glu Asp Ser Lys Gly Tyr Asn Pro Ser
 [0061] 50 55 60
 [0062] Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Ala
 [0063] 65 70 75 80
 [0064] Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 [0065] 85 90 95
 [0066] Cys Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly Tyr Phe Trp Phe Pro Tyr Trp Gly
 [0067] 100 105 110
 [0068] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 [0069] 115 120 125
 [0070] Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 [0071] 130 135 140
 [0072] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 [0073] 145 150 155 160
 [0074] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 [0075] 165 170 175
 [0076] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 [0077] 180 185 190

[0078]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
[0079]	195 200 205
[0080]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
[0081]	210 215 220
[0082]	Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
[0083]	225 230 235 240
[0084]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0085]	245 250 255
[0086]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
[0087]	260 265 270
[0088]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0089]	275 280 285
[0090]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0091]	290 295 300
[0092]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0093]	305 310 315 320
[0094]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
[0095]	325 330 335
[0096]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0097]	340 345 350
[0098]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0099]	355 360 365
[0100]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0101]	370 375 380
[0102]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0103]	385 390 395 400
[0104]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0105]	405 410 415
[0106]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0107]	420 425 430
[0108]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0109]	435 440 445
[0110]	<210> 8
[0111]	<211> 213
[0112]	<212> PRT
[0113]	<213> Artificial sequence
[0114]	<400> 8
[0115]	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0116]	1 5 10 15

[0117]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn Val Asn Asn Tyr
[0118]	20 25 30
[0119]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
[0120]	35 40 45
[0121]	Phe Asn Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0122]	50 55 60
[0123]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0124]	65 70 75 80
[0125]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Trp Thr Thr
[0126]	85 90 95
[0127]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[0128]	100 105 110
[0129]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[0130]	115 120 125
[0131]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[0132]	130 135 140
[0133]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[0134]	145 150 155 160
[0135]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[0136]	165 170 175
[0137]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
[0138]	180 185 190
[0139]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
[0140]	195 200 205
[0141]	Asn Arg Gly Glu Cys
[0142]	210

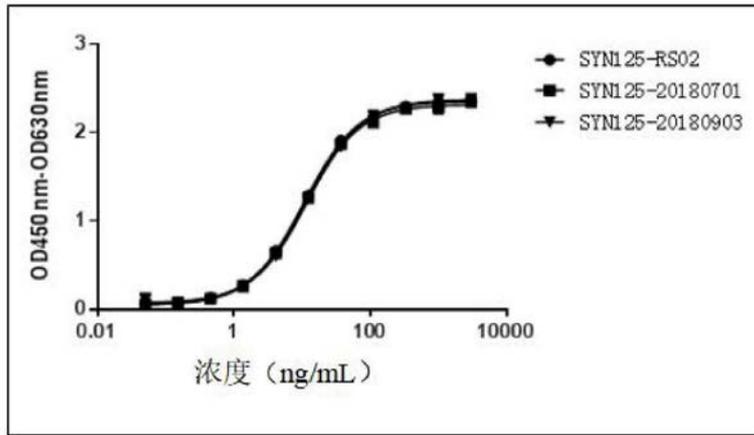


图1

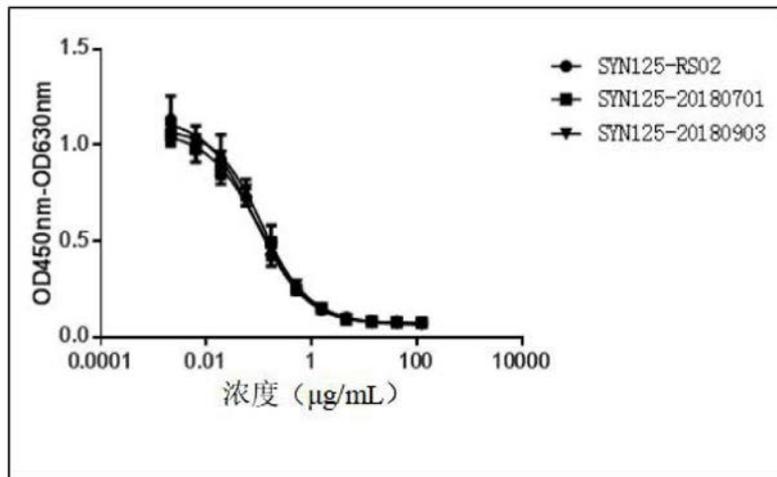


图2

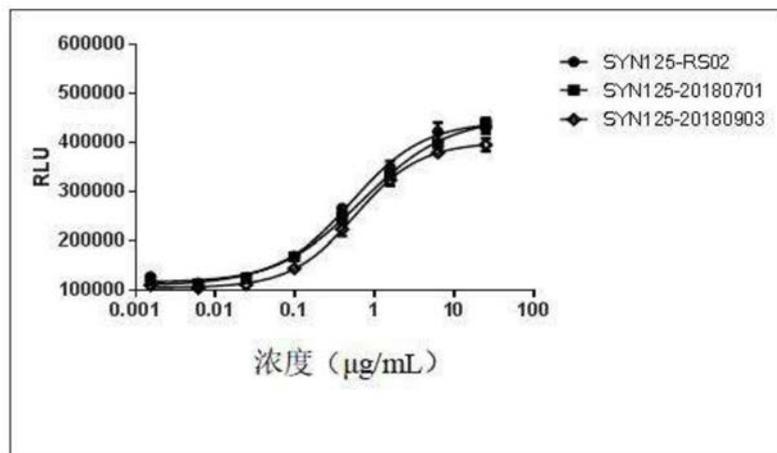


图3