



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102049045 A

(43) 申请公布日 2011.05.11

(21) 申请号 201010613946.7

A61P 37/06(2006.01)

(22) 申请日 2003.08.15

(30) 优先权数据

10/222,140 2002.08.16 US

(62) 分案原申请数据

03824272.9 2003.08.15

(71) 申请人 艾博特生物技术有限公司

地址 百慕大汉密尔顿

(72) 发明人 H·-J·克劳泽 L·鲍斯特

M·迪克斯

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/12(2006.01)

A61K 47/34(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 20 页 序列表 10 页
附图 0 页

(54) 发明名称

用于治疗 TNF- α 相关病症的人抗体的制剂

(57) 摘要

本申请发明名称为“用于治疗 TNF- α 相关病症的人抗体的制剂”。描述了一种液体含水药物制剂,它具有高蛋白浓度, pH 为大约 4-8,并且具有增强的稳定性。

1. 一种选自下组的药物制剂：
 - (a) 液体含水药物制剂,包括存在于缓冲液中的治疗有效量的抗体,该制剂的 pH 为大约 4-8,并且保质期至少为 18 个月;
 - (b) 含水药物制剂,包括存在于缓冲液中的治疗有效量的抗体,该制剂的 pH 为大约 4-8,并且在液体状态下的保质期至少为 18 个月;
 - (c) 液体含水药物制剂,包括存在于缓冲液中的治疗有效量的抗体,该制剂的 pH 为大约 4-8,所述制剂能在至少 3 次冻 / 融循环之后保持稳定性;和
 - (d) 液体含水药物制剂,包括存在于缓冲液中的治疗有效量的抗体,该制剂的 pH 为 4-8,并且在 2-8°C 的温度下具有至少 12 个月的增强的稳定性。
2. 如权利要求 1 的制剂,其中,所述抗体针对 TNF α 。
3. 如权利要求 1 的制剂,其中,所述抗体的浓度大约为 1-150mg/ml。
4. 如权利要求 1 的制剂,其中,所述抗体的浓度大约为 50mg/ml。
5. 如权利要求 1 的制剂,它还适合进行单次皮下注射。
6. 如权利要求 1 的制剂,其中,所述抗体是抗体或其抗原结合部分,从人 TNF α 解离的 K_d 为 $1 \times 10^{-8}M$ 或以下,并且 K_{off} 速度常数为 $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ 或以下,两种参数都是通过表面等离子共振测定的,并且,在标准体外 L929 测定中,能中和人 TNF α 细胞毒性,其 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7}M$ 或以下。
7. 如权利要求 6 的制剂,其中,所述抗体或其抗原结合部分,是重组抗体或其抗原结合部分。
8. 如权利要求 1 的制剂,其中,所述抗体是抗体或其抗原结合部分,它：
 - a) 从人 TNF α 解离的 K_{off} 速度常数为 $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ 或以下,该参数是通过表面等离子共振测定的;
 - b) 具有轻链 CDR3 结构域,该结构域包括 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列,或通过 1,4,5,7 或 8 号位置上进行单丙氨酸取代或在 1,3,4,6,7,8 和 / 或 9 号位置上进行 1-5 个保守性氨基酸取代对 SEQ ID NO :3 进行修饰得到的氨基酸序列;
 - c) 具有重链 CDR3 结构域,该结构域包括 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列,或通过 2,3,4,5,6,8,9,10 或 11 号位置上进行单丙氨酸取代或在 2,3,4,5,6,8,9,10,11 和 / 或 12 号位置上进行 1-5 个保守性氨基酸取代对 SEQ ID NO :4 进行修饰得到的氨基酸序列。
9. 如权利要求 1 的制剂,其中,所述抗体或其抗原结合部分,具有包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 和包括 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)。
10. 如权利要求 1 的制剂,其中,所述抗体或其抗原结合部分,能中和人 TNF α , 黑猩猩 TNF α 和选自下组的至少一种其他灵长类动物 TNF α 的活性:狒狒 TNF α , 狨猴 TNF α , 猕猴 TNF α 和恒河猴 TNF α 。
11. 如权利要求 1 的制剂,其中,所述抗体或其抗原结合部分,还能中和小鼠 TNF α 和 / 或猪 TNF α 的活性。
12. 如权利要求 1 的制剂,其中,所述抗体或其抗原结合部分,它能结合人 TNF α , 并且是抗体 D2E7 或其抗原结合部分。
13. 含水的药用组合物,包括多元醇,表面活性剂,含柠檬酸盐和 / 或磷酸盐的缓冲系统, pH 为大约 4-8,其用量足以配制用于治疗目的的浓度超过大约 45mg/ml 的抗体。

14. 如权利要求 13 的药用组合物,其中,所述多元醇是甘露糖醇,而所述表面活性剂是失水山梨醇聚氧乙烯(20)醚油酸酯。

15. 如权利要求 14 的药用组合物,它包括 5-20mg/ml 的甘露糖醇和 0.1-10mg/ml 的失水山梨醇聚氧乙烯(20)醚油酸酯。

16. 如权利要求 13 的制剂,它包括抗体或其抗原结合部分,它结合人 TNF α , 并且是抗体 D2E7 或其抗原结合部分。

17. 液体含水药物制剂,包括

(a) 1-150mg/ml 的抗体,

(b) 5-20mg/ml 的甘露糖醇,

(c) 0.1-10mg/ml 的吐温-80,和

(d) 含柠檬酸盐和 / 或磷酸盐的缓冲系统, pH 为 4-8。

18. 如权利要求 17 的制剂,其中,所述 pH 选自下组:大约 4.5- 大约 6.0, 大约 4.8- 大约 5.5, 和大约 5.0- 大约 5.2。

19. 如权利要求 17 的液体含水药物制剂,它包括

(a) 大约 50mg/ml 的抗体,

(b) 大约 12mg/ml 的甘露糖醇,

(c) 大约 1mg/ml 的吐温-80,和

(d) 含柠檬酸盐和 / 或磷酸盐的缓冲系统, pH 为大约 4- 大约 8。

20. 如权利要求 17 的制剂,其中,所述缓冲系统包括

(a) 大约 1.3mg/ml 的柠檬酸,

(b) 大约 0.3mg/ml 的柠檬酸钠,

(c) 大约 1.5mg/ml 的二水合磷酸氢二钠,

(d) 大约 0.9mg/ml 的二水合磷酸二氢钠,和

(e) 大约 6.2mg/ml 的氯化钠。

21. 如权利要求 19 的制剂,其中,所述抗体针对 TNF α 。

22. 如权利要求 19 的制剂,其中,所述抗体或其抗原结合部分,能结合人 TNF α , 并且是抗体 D2E7 或其抗原结合部分。

23. 如权利要求 22 的制剂,将它施用于患有其中 TNF α 活性是有害的病症的受试者,使得所述受试者体内 TNF α 活性受到抑制。

用于治疗 TNF- α 相关病症的人抗体的制剂

[0001] 本申请是申请日为 2003 年 8 月 15 日,申请号为 03824272.9,发明名称为“用于治疗 TNF- α 相关病症的人抗体的制剂”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是由多种类型的细胞产生的细胞因子,包括单核细胞和巨噬细胞,最初是根据它们诱导某些小鼠肿瘤坏死的能力鉴定的(例如,参见,01d, L. (1985) *Science* 230 :630-632)。随后,证实了与恶病质相关的被称为恶病质蛋白的因子是与 TNF- α 相同的分子。业已证实 TNF- α 与介导休克相关(例如,参见, Beutler, B. 和 Cerami, A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57 :505-518 ;Beutler, B. And Cerami, A. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7 :625-655)。另外,业已证实 TNF- α 与多种其他人类疾病和失调的病理生理学相关,包括脓毒症,感染,自身免疫性疾病,移植排斥和移植物抗宿主病(例如,参见, Moeller, A., 等 (1990) *Cytokine* 2 :162-169 ;Moeller 等的美国专利 5, 231, 024 ;Moeller, A. 等的欧洲专利公开 260 610 B1, Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10 :411-452 ; Tracey, K. J. 和 Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45 :491-503)。

[0004] 由于人 TNF α (hTNF α) 在多种人类疾病中的有害作用,业已设计了治疗方案,以抑制或抵消 hTNF α 活性。具体地讲,业已寻求能结合并且中和 hTNF- α 的抗体,作为抑制 hTNF α 活性的手段。所述抗体中的一些最早的抗体是由杂交瘤分泌的小鼠单克隆抗体 (mAbs),所述杂交瘤是用 hTNF α 免疫的小鼠的淋巴细胞制备的(例如,参见, Hahn T ;等, (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82 :3814-3818 ;Liang, C-M., 等 (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137 :847-854 ;Hirai, M., 等 (1987) *J. Immunol. Methods* 96 :57-62 ;Fendly, B. M., 等 (1987) *Hybridoma* 6 :359-370 ;Moeller, A., 等 (1990) *Cytokine* 2 :162-169 ; Moeller 等的美国专利 5, 231, 024 ;Wallach, D. 的欧洲专利公开 186 833 B1 ;01d 等的欧洲专利申请公开 218868A1 ;Moeller, A. 等的欧洲专利公开 260 610 B1)。尽管这些小鼠抗 -hTNF- α 抗体通常表现出对 hTNF α 的高的亲和力(例如, $K_d \leq 10^{-9}M$),并且能够中和 hTNF α 活性,它们在体内的应用可能会受到与将小鼠抗体用于人类相关的问题的制约,如短的血清半衰期,不能够诱导某些人效应物功能,并且在人体内引发不希望的对所述小鼠抗体的免疫反应(“人抗-小鼠抗体”(HAMA)反应)。

[0005] 为了克服与将全鼠抗体用于人体相关的问题,业已通过遗传工程方法使鼠抗 -hTNF α 抗体更“人样”。例如,业已制备了嵌合抗体,其中,所述抗体链的可变区是源于鼠的,而所述抗体链的恒定区是源于人的(Knight, D. M, 等 (1993) *Mol. Immunol.* 30 : 1443-1453 ;Daddona, P. E., 等的 PCT 公开 WO 92/16553)。另外,业已制备了人源化抗体,其中,所述抗体可变区的高变区是源于鼠的,而所述可变区的其余部分和抗体恒定区是源于人的(Adair, J. R. 等的 PCT 公开 WO 92/11383)。不过,由于所述嵌合的和人源化抗体仍然保持了某些鼠序列,它们仍然会诱导不希望的免疫反应,所述人抗-嵌合抗体 (HACA) 反应,特别是在长期施用时的反应,例如,用于慢性疾病,如类风湿关节炎时更是如此(例如,参见, Elliott, M. J., 等 (1994) *Lancet* 344 :1125-1127 ;Elliot, M. J., 等 (1994) *Lancet* 344 : 1105-1110)。

[0006] 对鼠 mAbs 或其衍生物（例如，嵌合的或人源化抗体）的优选的 hTNF α 抑制剂将是全人的抗 hTNF α 抗体，因为这种试剂不会引起 HAMA 反应，即使是长期使用也是如此。业已利用杂交瘤技术制备了抗 hTNF α 的人单克隆自身抗体 (Boyle, P., 等 (1993) Cell. Immunol. 152 :556-568 ;Boyle, P., 等 (1993) Cell. Immunol. 152 :569-581 ;Boyle 等的欧洲专利申请公开 614 984 A2)。不过，据报导，所述杂交瘤衍生的单克隆自身抗体对 hTNF α 的亲和力太低，以至于不能通过常规方法计算，这种抗体不能结合可溶性 hTNF α ，并且不能中和 hTNF α - 诱导的细胞毒性（参见 Boyle, 等 ;同上）。另外，人杂交瘤技术的成功取决于产生对 hTNF α 特异的自身抗体的淋巴细胞在人外周血中的天然存在。某些研究业已检测到了人类受试者中抗 hTNF α 的血清自身抗体 (Fomsgaard, A., 等 (1989) Scand. J. Immunol. 30 :219-223 ;Bendtzen, K., 等 (1990) Prog. Leukocyte Biol. 10B :447-452)，而其他研究没有 (Leusch, H-G., 等 (1991) J. Immunol. Methods 139 :145-147)。

[0007] 作为天然存在的人抗 hTNF α 抗体的替代，可以使用重组 hTNF α 抗体。业已披露了能以较低的亲和力（即， K_d 约 10^{-7} M）和快的解离速度（即， K_{off} 约 10^{-2} 秒 $^{-1}$ ）结合 hTNF α 的重组人抗体 (Griffiths, A. D., 等 (1993) EMBOJ. 12 :725-734)。不过，由于它们较快的解离动力学，这种抗体可能不适合治疗用途。另外，业已披露了重组人抗 hTNF α 不能中和 hTNF α 活性，相反能促进 hTNF α 与细胞表面的结合，并且促进 hTNF α 的内化 (Lidbury, A., 等 (1994) Biotechnol. Ther. 5 :27-45 ;Aston, R. 等的 PCT 公开 WO 92/03145)。

[0008] 另外，业已披露了能够以高的亲和力和慢的解离动力学结合可溶性 hTNF α ，并且具有中和 hTNF α 活性的能力的重组人抗体，包括 hTNF α - 诱导的细胞毒性（体外和体内）和 hTNF α - 诱导的细胞活化（参见美国专利 6, 090, 382）。

[0009] 发明概述

[0010] 需要具有长的保质期的稳定的含水药物制剂，它包括适合治疗用途的抗体，以便抑制或抵消有害的 hTNF α 活性。还需要具有长的保质期的稳定的含水药物制剂，它包括适合治疗用途的抗体，这种药物制剂便于施用，并且含有高蛋白浓度。

[0011] 本发明提供了液体含水药物制剂，由存在于缓冲液中的治疗有效量的抗体组成，形成了 pH 大约 4- 大约 8 的制剂，并且保质期至少为 18 个月。本发明还包括含水药物制剂，包括存在于缓冲液中的治疗有效量的抗体，形成了 pH 大约为 4-8 的制剂，并且在液体状态下的保质期至少为 18 个月。在一种实施方案中，所述药物制剂具有增强了的稳定性。在另一种实施方案中，本发明的制剂在经过至少 3 次冻 / 融循环之后是稳定的。在另一种实施方案中，所述抗体针对 TNF α 。在另一种实施方案中，所述抗体针对人 TNF α 。在另一种实施方案中，所述抗体是 D2E7。

[0012] 本发明还提供了液体含水药物制剂，包括存在于缓冲液中的治疗有效量的抗体，形成了 pH 为 4-8 的制剂，并且在 2-8 $^{\circ}$ C 下具有至少 12 个月的增强了的稳定性。在一种实施方案中，所述制剂具有至少 18 个月增强了的稳定性。在另一种实施方案中，所述抗体针对 TNF α 。在另一种实施方案中，所述抗体针对人 TNF α 。在另一种实施方案中，所述抗体是 D2E7。

[0013] 本发明还提供了液体含水药物制剂，包括存在于缓冲液中的治疗有效量的抗体，形成了 pH 为大约 4- 大约 8 的制剂，它是便于施用的。在一种实施方案中，所述抗体针对 TNF α 。在另一种实施方案中，所述抗体针对人 TNF α 。在另一种实施方案中，所述抗体是

D2E7。

[0014] 在本发明的一种实施方案中,所述液体含水药物制剂是适合注射的。在另一种实施方案中,所述制剂是适合单次皮下注射使用的。在另一种实施方案中,所述抗体在所述液体含水药物制剂中的浓度为大约 1-150mg/ml。在另一种实施方案中,所述制剂中抗体的浓度为大约 50mg/ml。在另一种实施方案中,所述制剂具有高蛋白浓度。在本发明的另一种实施方案中,所述制剂不是光敏感的。

[0015] 在本发明的一种实施方案中,所述液体含水药物制剂包括抗体或其抗原结合部分,它从人 TNF α 解离的 K_d 为 $1 \times 10^{-8}M$ 或以下,并且 K_{off} 速度常数为 $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ 或以下,两种参数都是通过表面等离子共振测定的,并且在标准体外 L929 测定中能中和人 TNF α 细胞毒性, IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7}M$ 或以下。在另一种实施方案中,本发明的制剂包括抗体或其抗原结合部分,它从人 TNF α 解离的 K_{off} 速度常数为 $5 \times 10^{-4}s^{-1}$ 或以下。在另一种实施方案中,所述制剂包括抗体或其抗原结合部分,它从人 TNF α 解离的 K_{off} 速度常数为 $1 \times 10^{-4}s^{-1}$ 或以下。在另一种实施方案中,本发明的制剂包括抗体或其抗原结合部分,在标准体外 L929 测定中, IC_{50} 为 $1 \times 10^{-8}M$ 或以下。在本发明的另一种实施方案中,所述要求保护的制剂包括抗体或其抗原结合部分在标准体外 L929 测定中能中和人 TNF α 细胞毒性,其 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-9}M$ 或以下。本发明的另一种实施方案中包括制剂,其中,所述抗体或其抗原结合部分,在标准体外 L929 测定中,它能中和人 TNF α 细胞毒性,其 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-10}M$ 或以下。

[0016] 在本发明的另一种实施方案中,所述液体含水药物制剂包括抗体或其抗原结合部分,它是重组抗体或其抗原结合部分。在另一种实施方案中,所述制剂包括抗体或其抗原结合部分,它能抑制人 TNF α - 诱导的 ELAM-1 在人脐静脉内皮细胞上的表达。在另一种实施方案中,所述要求保护的制剂包括 D2E7 抗体。

[0017] 在本发明的另一种实施方案中,所述液体含水药物制剂包括抗体或其抗原结合部分,它从人 TNF α 解离的 K_{off} 速度常数为 $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ 或以下,该参数是通过表面等离子共振测定的;

[0018] b) 具有轻链 CDR3 结构域,该结构域包括 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列,或通过 1, 4, 5, 7 或 8 号位置上进行单丙氨酸取代或通过 1, 3, 4, 6, 7, 8 和 / 或 9 号位置上进行 1-5 个保守性氨基酸取代对 SEQ ID NO :3 进行修饰所得到的氨基酸序列;

[0019] c) 具有重链 CDR3 结构域,包括 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列,或通过 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11 号位置上进行单丙氨酸取代或在 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 和 / 或 12 号位置上进行 1-5 个保守性氨基酸取代对 SEQ ID NO :4 进行修饰的所得到的氨基酸序列。在另一种实施方案中,本发明的制剂包括抗体或其抗原结合部分,它从人 TNF α 解离的 K_{off} 速度常数为 $5 \times 10^{-4}s^{-1}$ 或以下。在本发明的另一种实施方案中,所述制剂包括抗体或其抗原结合部分,它从人 TNF α 解离的 K_{off} 速度常数为 $1 \times 10^{-4}s^{-1}$ 或以下。

[0020] 在本发明的另一种实施方案中,所述液体含水药物制剂,包括抗体或其抗原结合部分,它具有轻链可变区 (LCVR),该可变区具有 CDR3 结构域,它包括 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列,或通过 1, 4, 5, 7 或 8 号位置上进行单丙氨酸取代对 SEQ ID NO :3 进行修饰所得到的氨基酸序列,并且具有重链可变区 (HCVR),它具有 CDR3 结构域,该结构域包括 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列,或通过 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11 号位置上进行单丙氨酸取代对 SEQ ID NO :4 进行修饰所得到的氨基酸序列。在另一种实施方案中,本发明的制剂包括抗体,其

中,所述抗体或其抗原结合部分的 LCVR 还具有 CDR2 结构域,该结构域包括 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列,并且所述抗体或其抗原结合部分的 HCVR 还具有 CDR2 结构域,该结构域包括 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列。在另一种实施方案中,本发明的制剂包括抗体,其中,所述抗体或其抗原结合部分的 LCVR 还具有 CDR1 结构域,该结构域包括 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,并且,HCVR 具有 CDR1 结构域,该结构域包括 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列。

[0021] 在本发明的另一种实施方案中,包含在所述液体含水药物制剂中的所述抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区 (LCVR),该可变区包括 SEQ IDNO:1 的氨基酸序列,并且具有重链可变区 (HCVR),该可变区包括 SEQ IDNO:2 的氨基酸序列。在另一种实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分具有 IgG1 重链恒定区。在另一种实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分,具有 IgG4 重链恒定区。在另一种实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分是 Fab 片段。在另一种实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分是单链 Fv 片段。

[0022] 在本发明的一种实施方案中,所述液体含水药物制剂包括抗体或其抗原结合部分,它具有轻链可变区 (LCVR) 或重链可变区 (HCVR),轻链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域包括选自下组的氨基酸序列:SEQ IDNO:3,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22,SEQ IDNO:23,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,重链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ IDNO:31,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:34。在另一种实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分能中和人 TNF α ,黑猩猩 TNF α 和选自下组的至少一种其他灵长类 TNF α 的活性:狒狒 TNF α ,狨猴 TNF α ,猕猴 TNF α 和恒河猴 TNF α 。在另一种实施方案中,本发明的制剂包括抗体或其抗原结合部分,它还能中和小鼠 TNF α 的活性。本发明的制剂还包括抗体或其抗原结合部分,它能中和猪 TNF α 的活性。

[0023] 在另一种实施方案中,本发明提供了液体含水药物制剂,它包括抗体或其抗原结合部分,它能结合人 TNF α ,并且包括:

[0024] 轻链 CDR3 结构域,它包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,或通过 1,4,5,7 或 8 号位置上进行单丙氨酸取代或在 1,3,4,6,7,8 和 / 或 9 号位置上进行 1-5 个保守性氨基酸取代对 SEQ ID NO:3 进行修饰的所得到的氨基酸序列,和

[0025] 重链 CDR3 结构域包括 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列,或通过 2,3,4,5,6,8,9,10 或 11 号位置上进行单丙氨酸取代或在 2,3,4,5,6,8,9,10,11 和 / 或 12 号位置上进行 1-5 个保守性氨基酸取代对 SEQIDNO:4 进行修饰得到的序列。在一种实施方案中,所述液体含水药物制剂包括抗体,该抗体能结合人 TNF α ,并且包括轻链可变区 (LCVR) 或重链可变区 (HCVR),轻链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ IDNO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ IDNO:26,重链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SFQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33 和 SEQID NO:34。在本发明的另一种实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分能结合人 TNF α ,并且

是抗体 D2E7 或其抗原结合部分。

[0026] 本发明还提供了含水的药用组合物,它包括多元醇,表面活性剂,含柠檬酸盐和/或磷酸盐的缓冲系统,pH 为大约 4-8,其用量足以配制用于治疗目的浓度超过大约 45mg/ml 的抗体。在一种实施方案中,所述多元醇是甘露糖醇,而所述表面活性剂是失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯。在另一种实施方案中,所述组合物包括 5-20mg/ml 的甘露糖醇,和 0.1-10mg/ml 的失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯。在另一种实施方案中,所述组合物包括抗体 D2E7。

[0027] 本发明还提供了液体含水药物制剂,它由 1-150mg/ml 的抗体,5-20mg/ml 的甘露糖醇,0.1-10mg/ml 的吐温 -80,以及柠檬酸盐和/或磷酸盐的缓冲系统组成,pH 为 4-8。在一种实施方案中,所述抗体针对 hTNF α 。在另一种实施方案中,所述制剂包括大约 40mg 的抗体。本发明还提供了液体含水药物制剂,它包括大约 50mg/ml 的抗体,大约 12mg/ml 的甘露糖醇,大约 1mg/ml 的吐温 -80,以及含柠檬酸盐和/或磷酸盐的缓冲系统,pH 为大约 4-大约 8。在一种实施方案中,所述制剂的 pH 为大约 4.5-大约 6.0。在另一种实施方案中,pH 为大约 4.8-大约 5.5。在另一种实施方案中,本发明的 pH 为大约 5.0-大约 5.2。

[0028] 在本发明的一种实施方案中,所述液体含水药物制剂还包括大约 1.305mg/ml 的柠檬酸,大约 0.305mg/ml 的柠檬酸钠,大约 1.53mg/ml 的二水合磷酸氢二钠,大约 0.86mg/ml 的二水合磷酸二氢钠,和大约 6.165mg/ml 的氯化钠。在另一种实施方案中,本发明的制剂包括抗体,它是针对 hTNF α 的。在另一种实施方案中,本发明的制剂包括抗体 D2E7。在另一种实施方案中,本发明的制剂给患有以下病症的受试者施用:其中 TNF α 活性是有害的,以便抑制所述受试者体内的 TNF α 活性。

[0029] 发明详述

[0030] 本发明涉及 pH 为大约 4-大约 8 的液体含水药物制剂,它包括高蛋白浓度,包括大约 1-大约 150mg/ml 的抗体浓度,并且具有增强了的稳定性。本发明还涉及用于治疗患有以有害的 TNF α 活性为特征的状况的受试者的液体含水药物制剂。本发明的制剂包括以下成分:能以高亲和力、低解离速度和高中和的能力结合人 TNF α 的抗体;缓冲液,它包括柠檬酸,柠檬酸钠,二水合磷酸氢二钠,和二水合磷酸二氢钠;渗透压调节剂,它包括甘露糖醇和氯化钠;去污剂,包括失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯;和用于调节 pH 的氢氧化钠。

[0031] 定义

[0032] 为了更便于理解本发明,首先对某些术语进行定义。

[0033] 术语“受试者”意在包括活的生物体,例如,真核生物和真核生物。受试者的例子包括哺乳动物,例如,人,犬,牛,马,猪,绵羊,山羊,猫,小鼠,兔,大鼠,和转基因非人动物。在本发明的具体实施方案中,所述受试者是人。

[0034] 术语“药物制剂”表示以下形式的制剂:它的形式使得活性成分的生物活性是明确有效的,并且它不包括对施用所述制剂的受试者明显有毒的其它成分。“可以药用的”赋形剂(载体,添加剂)能够合理地施用于哺乳动物动物受试者,以便提供有效剂量的所采用的活性成分。

[0035] “稳定的”制剂是这样的制剂,其中,在保存时,其中的抗体基本上能保持它的物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性。在本领域中可以获得用于测定蛋白稳定性的各种分析技术,并且在以下文献中作过综述:例如,Peptide and Protein Drug

Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) 和 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993)。可以在选定温度下用选定时间测定稳定性。优选的是,所述制剂在室温(大约 30°C)或 40°C 下能稳定至少 1 个月和 / 或在大约 2-8°C 下稳定至少 1 年或 2 年。另外,所述制剂优选在进行冷冻(例如,冷冻至 -70°C)或解冻,以下称之为“冻 / 融循环”之后是稳定的。

[0036] 如果在通过对颜色和 / 或透明度进行肉眼检查,或通过 UV 光散射或通过大小排阻层析测定时基本没有表现出明显的聚集,沉淀和 / 或变性的迹象,则药物制剂中的抗体“保持它的物理稳定性”。

[0037] 如果在特定时间化学稳定性使得抗体被认为仍然保留了下面所定义的生物学活性,则在药物制剂中所述抗体“保持它的化学稳定性”。可以通过检测和定量所述抗体的化学改变形式评估化学稳定性。化学改变可能涉及大小改变(例如,剪切),例如,可以通过采用大小排阻层析, SDS-PAGE 和 / 或矩阵辅助的激光解析离子化 / 飞行时间质谱分析 (MALDI/TOF MS) 进行评估。其他类型的化学改变包括电荷改变(例如,因为脱酰胺导致的改变),例如,可以通过离子交换层析对它进行评估。

[0038] 如果一种药物制剂中的抗体具有它预期用途的生物学活性,则所述抗体在药物制剂中“保持它的生物学活性”。例如,如果所述药物制剂中的抗体的生物学活性为在制备所述药物制剂时所表现出的生物学活性的大约 30%, 大约 20%, 或大约 10% (在测定的误差范围内)内,就认为保持了它的生物学活性(例如,通过抗原结合测定确定)。

[0039] “等渗”是本领域所公认的术语。例如,等渗可以表示感兴趣的制剂具有与人血液基本上相同的渗透压。等渗制剂通常具有大约 250-350mOsm 的渗透压。例如,等渗可以采用蒸汽压力或冰冻型渗压计测定。“渗透压调节剂”是能使所述制剂等渗的化合物。

[0040] “多元醇”是具有多个羟基的物质,并且包括糖(还原糖和非还原糖),糖醇和糖酸。本发明的优选的多元醇的分子量低于大约 600kD(例如,在大约 120- 大约 400kD 范围内)。“还原糖”是包括半缩醛基的糖,它能够还原金属离子或与蛋白中的赖氨酸和其他氨基共价反应,而“非还原糖”是不具备还原糖的上述特征的糖。还原糖的例子包括果糖,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。糖醇的例子包括甘露糖醇,木糖醇,赤藓糖醇,苏糖醇,山梨糖醇和甘油。至于糖酸,包括 L- 葡萄糖酸和它的金属盐。如果需要所述制剂是冻-融稳定的,所述多元醇优选是在冷冻温度(例如, -20°C)下不会结晶的,以便它使所述制剂中的抗体去稳定化。所述多元醇还可以起着渗透压调节剂的作用。在本发明的一种实施方案中,所述制剂的一种成分是浓度为 -20mg/ml 的甘露糖醇。在本发明的优选实施方案中,甘露糖醇的浓度为 7.5-15mg/ml。在本发明的更优选的实施方案中,甘露糖醇的浓度为 10-14mg/ml。

[0041] 在本文中,“缓冲液”表示缓冲溶液,它能够通过它的酸碱共轭成分的作用抑制 pH 的改变。本发明缓冲液的 pH 为大约 4- 大约 8; 优选大约 4.5- 大约 7; 最优选的 pH 为大约 5.0- 大约 6.5。能够将 pH 控制在该范围内的缓冲液的例子包括乙酸盐(例如,乙酸钠),琥珀酸盐(如琥珀酸钠),葡萄糖酸盐,组氨酸,柠檬酸和其他有机酸缓冲液。

[0042] 在药理学含义上,在本发明的范围内,抗体的“治疗有效量”或“有效量”表示在预防或治疗疾病方面的有效量,对于所述疾病的治疗来说,所述抗体是有效的。“病症”是

能够用所述抗体治疗获益的任何状况。其中包括慢性和急性病症或疾病,包括倾向于使受试者出现相关病症的病理学状态。

[0043] “防腐剂”是可以添加在所述制剂中以便显著其中的细菌作用,例如,因此促进多用途制剂的生产的化合物。潜在的防腐剂的例子包括十八烷基二甲基苄基氯化铵,氯化己烷双胺,杀藻胺(烷基苄基二甲基氯化铵的混合物,其中,所述烷基是长链化合物),和氯化苄乙氧铵。其他类型的防腐剂包括芳香醇,如苯酚,丁醇和苯甲醇,烷基对羟基苯甲酸酯,如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯,儿茶酚,间苯二酚,环己醇,3-戊醇,和间-甲酚。

[0044] “治疗”表示治疗性治疗和预防性或防御性措施。需要治疗的受试者包括业已患有有关病症的受试者,以及需要预防有关疾病的受试者。

[0045] 在本文中,短语“肠胃外施用”和“通过肠胃外施用”表示除了肠道和局部施用以外的施用模式,通常通过注射施用,并且包括,但不局限于静脉内,肌内,动脉内,鞘内,囊内,眶内,心脏内,皮内,腹膜内,经气管,皮下,表皮下,关节内,囊下,蛛网膜下,脊柱内和膜内注射和输液。

[0046] 本文所使用的短语“系统施用”,“系统性地施用”,“外周施用”和“通过外周施用”表示以除了直接用于中枢神经系统以外的方式施用化合物,药物或其他材料,以便它进入患者的系统,因此,会进行代谢和其他类似过程,例如,皮下施用。

[0047] 短语“可以药用的载体”是本领域所公认的术语,并且包括适合给哺乳动物施用的可以药用的材料,组合物或媒介物。所述载体包括液体或固体填充物,稀释剂,赋形剂,溶剂或胶囊化材料,涉及到将所述主题试剂从身体的一个器官或部分携带或转运到身体的另一个器官或部分。在与所述制剂的其他成分兼容并且不会对患者造成伤害的含义上,每一种载体必须是“可接受的”。

[0048] 在本文中,术语“人 TNF α ”(本文简称为 hTNF α ,或简单地表示为 hTNF),意在表示人细胞因子,它是以 17kD 的分泌形式和 26kD 膜缔合形式存在的,它的生物学活性形式包括共价结合的 17kD 分子的三聚体。hTNF α 的结构进一步披露于以下文献中:例如, Pennica, D., 等 (1984) *Nature* 312:724-729; Davis, J. M., 等 (1987) *Biochemistry* 26:1322-1326; 和 Jones, E. Y., 等 (1989) *Nature* 338:225-228。术语人 TNF α 意在包括重组人 TNF α (rhTNF α),它可以是通过标准重组表达方法制备的或通过商业渠道购买的 (R & D Systems, Catalog No. 210-TA, Minneapolis, MN)。

[0049] 在本文中,术语“抗体”意在表示由四个多肽链组成的免疫球蛋白分子,其中两个重(H)链和两个轻(L)链,通过二硫键相互连接在一起。每一个重链由重链可变区(本文简称为 HCVR 或 VH)和重链恒定区组成。所述重链恒定区由三个结构域 CH1, CH2 和 CH3 组成。每一个轻链包括轻链可变区(本文简称为 LCVR 或 VL)和轻链恒定区。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区还可以进一步细分成超变区,它被称为互补性决定区(CDR),其中间隔有更保守的,并称为构架区(FR)的区域。每一个 VH 和 VL 由三个 CDRs 和四个 FRs 组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。在本发明的一种实施方案中,所述制剂包括具有 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列的抗体,正如在分别被收作本文参考的美国专利号 6,090,382 和 6,258,562 中所披露的。

[0050] 在本文中,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”),表示保留了能特异性结合抗原(例如,hTNF α)的抗体的一个或多个片段。业已证实,抗体的抗原结合功能

可以通过全长抗体的片段实现。包含在术语抗体的“抗原结合部分”的含义内的结合片段的例子包括 (i) Fab 片段, 它是由 VL, VH, CL 和 CH1 结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂ 片段, 它是二价片段, 包括通过二硫键在铰链区连接在一起的两个 Fab 片段; (iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体的单个臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段, (v) dAb 片段 (Ward 等, (1989) Nature 341 :544-546), 它由 VH 结构域组成, 和 (vi) 分离的互补性决定区 (CDR)。另外, 尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 是由独立的基因编码的, 可以通过重组方法用合成的接头将它们连接在一起, 使它们能够以单个蛋白链的形式生产, 其中, VL 和 VH 区配对, 以便形成一价分子 (被称为单链 Fv (scFv)); 例如, 参见, Bird 等 (1988) Science 242 :423-426; 和 Huston 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883)。所述单链抗体也被认为包括在术语抗体的“抗原结合部分”的含义内。还包括其他形式的单链抗体, 如双抗体。双抗体是二价的, 双特异性抗体, 其中, VH 和 VL 结构域是在单条多肽链上表达的, 不过, 使用的接头太短, 以至于不能使得同一条链上的这两个结构域配对, 从而迫使所述结构域与另一条链上的互补的结构域配对, 并且产生两个抗原结合位点 (例如, 参见, Holliger, P., 等 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448; Poljak, R. J., 等 (1994) Structure 2 :1121-1123)。在本发明的一种实施方案中, 所述制剂包括披露于分别被收作本文参考的美国专利号 6, 090, 382 和 6, 258, 562 中的抗原结合部分。

[0051] 另外, 抗体或其抗原结合部分可以是较大的免疫粘附分子的一部分, 它是通过所述抗体或抗体部分与一种或多种其他蛋白或肽共价或非共价缔合形成的。所述免疫粘附分子的例子包括利用抗生物素蛋白链菌素核心区制备四聚体 scFv 分子 (Kipriyanov, S. M., 等 (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6 :93-101), 并且用半胱氨酸残基, 标记肽和 C- 末端聚组氨酸标记制备二价和生物素化的 scFv 分子 (Kipriyanov, S. M., 等 (1994) Mol. Immunol. 31 :1047-1058)。抗体部分, 如 Fab 和 F(ab')₂ 片段可以利用常规技术用完整抗体制备, 如分别用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗体制备。另外, 可以通过采用本文所披露的标准重组 DNA 技术获得抗体, 抗体部分和免疫粘附分子。

[0052] 在本文中, 术语“人抗体”, 意在包括具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码 (例如, 通过体外随机或定点诱变导入的突变或通过体内体细胞突变导入的突变) 的氨基酸残基, 例如, 在 CDRs 中, 特别是 CDR3 中。不过, 在本文中, 术语“人抗体”不希望包括这样的抗体, 其中, 源于诸如小鼠的另一种哺乳动物种系的 CDR 系列业已嫁接到人构架序列上。

[0053] 在本文中, 术语“重组人抗体”, 意在包括通过重组方法制备, 表达, 生产或分离的人抗体, 如利用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体 (在下面的第 II 部分进一步说明), 从重组的, 组合的人抗体文库中分离的抗体 (在下面的第 III 部分进一步说明), 从用人免疫球蛋白基因进行转基因的动物 (例如, 小鼠) 中分离的抗体 (例如, 参见 Taylor, L. D., 等 (1992) Nucl. Acids Res. 20 :6287-6295), 或通过任何其他方法制备, 表达, 生产, 或分离的抗体, 所述方法包括将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他 DNA 序列上。所述重组人抗体具有源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。不过, 在某些实施方案中, 所述重组人抗体接受了体外诱变 (或在使用用人 Ig 序列转基因的转基因动物时, 进行体内体细胞诱变), 因此所述重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列尽管是源于人种系 VH 和 VL 序列或与所述序列相关, 但是在体内的人抗体种系所有组成成分中可能不是天然存在的。

[0054] 在本文中，“分离的抗体”，意在表示基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体（例如，能特异性结合 hTNF α 的分离的抗体基本上不含能特异性地结合除了 hTNF α 以外的抗原的抗体）。不过，能特异性地结合 hTNF α 的分离的抗体可能具有与其他抗原，如，来自其他物种的 TNF α 分子的交叉反应性。另外，分离的抗体可能基本上不含其他分子材料和 / 或化学物质。

[0055] 在本文中，“中和抗体”（或“能中和 hTNF α 活性的抗体”），意在表示它与 hTNF α 的结合导致了对 hTNF α 的生物学活性的抑制作用的抗体。对 hTNF α 的生物学活性的抑制可以通过测定 hTNF α 生物学活性的一种或多种指标评估，如 hTNF α 诱导的细胞毒性（体外或体内），hTNF α 诱导的细胞激活和 hTNF α 与 hTNF α 受体的结合。hTNF α 生物学活性的上述指标可以通过本领域所公知的一种或多种标准体外或体内测定方法评估，并且，这些方法披露于被分别收作本文参考的美国专利号 6,090,382 和 6,258,562 中。优选的是，抗体中和 hTNF α 活性的能力是通过抑制 L929 细胞中的 hTNF α 诱导的细胞毒性评估的。作为 hTNF α 活性的另一种或替代的参数，可以评估抗体抑制 hTNF α 诱导的 ELAM-1 在 HUVEC 上表达的能力，作为 hTNF α 诱导的细胞激活的指标。

[0056] 在本文中，术语“表面等离子共振”，表示可以通过在生物传感器基质中检测蛋白浓度改变分析实时生物特异性相互作用的光学现象，例如，使用 BIAcore 系统（Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ）。有关进一步的说明，参见 **Jönsson**, U., 等 (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; **Jönsson**, U., 等 (1991) *Biotechniques* 11:620-627; **Jöhnsson**, B., 等 (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; 和 **Jöhnsson**, B., 等 (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277。

[0057] 在本文中，术语“ K_{off} ”意在表示抗体从抗体 / 抗原复合物解离的解离速度常数。

[0058] 在本文中，术语“ K_d ”意在表示特定抗体 - 抗原相互作用的解离常数。

[0059] II. 所述制剂的抗体

[0060] 本发明涉及液体含水药物制剂，包括存在于缓冲液中的治疗有效量的抗体，构成了 pH 为大约 4- 大约 8 的制剂，并且具有较长的保质期，优选至少 18 个月。在另一种实施方案中，本发明的液体含水药物制剂具有增强了的稳定性。在本发明的另一种实施方案中，所述制剂不是光敏感的。在本发明的另一种实施方案中，所述要求保护的制剂在至少 3 次冻 / 融循环之后保持稳定。在另一种实施方案中，本发明的药物制剂适合单次皮下注射使用。

[0061] 可用于所述制剂中的抗体包括多克隆抗体，单克隆抗体，重组抗体，单链抗体，杂合抗体，嵌合抗体，人源化抗体，或它们的片段。还可以使用包括一个或两个用于结合抗原的结合位点和免疫球蛋白的 Fc- 部分的抗体样分子。抗体样分子的例子是活性成分 etanercept 或 infliximab。用于所述制剂中的优选抗体是人抗体，它是从人细胞或从代表人抗体所有组成成分的基因文库中克隆的。特别优选的人抗体是针对抗原 TNF α ，包括人 TNF α （或 hTNF α ）的抗体。

[0062] 在一种实施方案中，本发明的制剂包括抗体（两种或两种以上）的组合，或抗体的“鸡尾酒”。例如，所述制剂可以包括抗体 D2E7 和一种或多种其他抗体。

[0063] 在本发明的优选实施方案中，所述制剂包括抗体或其抗原结合部分，从人 TNF α 解离的 K_d 为 1×10^{-8} M 或以下，并且 K_{off} 速度常数为 1×10^{-3} s⁻¹ 或以下，两种参数都是通过表

面等离子共振测定的,并且在标准体外 L929 测定中能中和人 TNF α 细胞毒性,其 IC₅₀ 为 1×10^{-7} M 或以下。在另一种优选实施方案中,本发明的制剂包括抗体或其抗原结合部分,如在分别被收作本文参考的美国专利号 6,090,382 和 6,258,562 中所披露的。

[0064] 在一个方面,本发明的制剂包括 D2E7 抗体和抗体部分, D2E7- 相关抗体和抗体部分,以及与 D2E7 具有相同特性的其他人抗体和抗体部分,如与 hTNF α 结合的高亲和力,低解离动力学和高中和能力。在另一种实施方案中,本发明的制剂包括分离的人抗体或其抗原结合部分,从人 TNF α 解离的常数 K_d 为 1×10^{-8} M 或以下,并且 K_{off} 速度常数为 1×10^{-1} s⁻¹ 或以下,两种参数都是通过表面等离子共振测定的,并且在标准体外 L929 测定中能中和人 TNF α 细胞毒性,其 IC₅₀ 为 1×10^{-7} M 或以下。更优选的是,所述分离的人抗体或其抗原结合部分,从人 TNF α 解离的 K_{off} 为 5×10^{-4} s⁻¹ 或以下,更优选, K_{off} 为 1×10^{-4} s⁻¹ 或以下。更优选,所述分离的人抗体或其抗原结合部分,在标准的体外 L929 测定中,能中和人 TNF α 细胞毒性,其 IC₅₀ 为 1×10^{-8} M 或以下,更优选其 IC₅₀ 为 1×10^{-9} M 或以下,更优选其 IC₅₀ 为 5×10^{-10} M 或以下。在优选实施方案中,所述制剂包括抗体,它是分离的人重组抗体或其抗原结合部分。在另一种优选实施方案中,所述制剂包括抗体,它还能中和 TNF α - 诱导的细胞激活,是利用用于分析 TNF α - 诱导的 ELAM-1 在人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 上表达的标准体外测定方法评估的。

[0065] III. 制剂的制备

[0066] 本发明涉及与本领域已知制剂相比具有改善了的特性的制剂(例如,蛋白制剂和/或抗体制剂)。例如,与本领域已知制剂相比,本发明的制剂具有改善了的保质期和/或稳定性。在优选方面,本发明的制剂包括高蛋白浓度,例如,包括超过大约 45mg/ml 的蛋白浓度,超过大约 50mg/ml 的蛋白浓度,超过大约 100mg/ml 的蛋白浓度,或超过大约 150mg/ml 的蛋白浓度。在本发明的优选实施方案中,所述蛋白是抗体。在另一种优选实施方案中,所述抗体是 D2E7。本发明还提供了含水的药用组合物,它包括多元醇,表面活性剂,和 pH 为大约 4-8 的包括柠檬酸盐和/或磷酸盐的缓冲系统,其用量足以制备用于治疗目的浓度超过例如大约 45mg/ml 的抗体。

[0067] 感兴趣的抗体的制备是按照本领域公知的标准方法进行的。在本发明的优选实施方案中,用于所述制剂中的抗体是在 CHO 细胞中表达的,并且通过一系列标准的层析步骤纯化。在另一种实施方案中,所述抗体针对 hTNF α , 并且,是按照披露于分别被收作本文参考的美国专利号 6,090,382 和 6,258,562 中的方法制备的。

[0068] 在制备感兴趣的抗体之后,制备含有所述抗体的药物制剂。例如,存在于所述制剂中的抗体的治疗有效量是通过考虑需要的剂量体积和施用模式决定的。在本发明的一种实施方案中,所述制剂中抗体的浓度为大约 1- 大约 150mg 抗体 / 每 ml 液体制剂。在优选实施方案中,所述制剂中抗体的浓度为大约 5- 大约 80mg/ml。在另一种优选实施方案中,所述制剂中抗体的浓度为大约 25- 大约 50mg/ml。所述制剂特别适用于超过 15mg/ml 的大的抗体剂量。在优选实施方案中,所述抗体的浓度为 50mg/ml。

[0069] 在本发明的另一种实施方案中,所述制剂中抗体的浓度为大约 1-150mg/ml, 大约 5-145mg/ml, 大约 10-140mg/ml, 大约 15-135mg/ml, 大约 20-130mg/ml, 大约 25-125mg/ml, 大约 30-120mg/ml, 大约 35-115mg/ml, 大约 40-110mg/ml, 大约 45-105mg/ml, 大约 50-100mg/ml, 大约 55-95mg/ml, 大约 60-90mg/ml, 大约 65-85mg/ml, 大约 70-80mg/ml, 或大

约 75mg/mL 介于上述浓度之间的范围,例如,大约 6-144mg/ml 也属于本发明的部分。例如,本发明包括使用上述任意值的组合作为上限和 / 或下限的值的范围。

[0070] 在一种实施方案中,本发明提供了具有长的保质期的制剂,包括活性成分,优选抗体,与甘露糖醇,一水合柠檬酸,柠檬酸钠,二水合磷酸氢二钠,二水合磷酸二氢钠,氯化钠,失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯,水,和氢氧化钠组合。在另一种实施方案中,本发明的制剂在液体状态下具有至少 18 个月的长的保质期。冷冻本发明的制剂还可以用于进一步延长它的保质期。

[0071] 制备了含水制剂,包括存在于 pH 缓冲溶液中的所述抗体。本发明的缓冲液的 pH 为大约 4- 大约 8,优选大约 4.5- 大约 6.0,更优选大约 4.8- 大约 5.5,最优选的 pH 为大约 5.0- 大约 5.2。介于上述 pH 之间的范围也被认为是本发明的一部分。例如,意在包括将上述任何值的组合作为上限和 / 或下限的值的范围。能够将 pH 控制在该范围内的缓冲液的例子包括乙酸盐 (例如乙酸钠),琥珀酸盐 (例如琥珀酸钠),葡糖酸盐,组氨酸,柠檬酸盐和其他有机酸缓冲液。

[0072] 在本发明的优选实施方案中,所述制剂包括缓冲系统,该系统包括磷酸盐和柠檬酸盐,以便将 pH 保持在大约 4- 大约 8。在另一种实施方案中,pH 范围为大约 4.5- 大约 6.0,更优选大约 pH 4.8- 大约 5.5,最优选的 pH 范围为大约 5.0- 大约 5.2。在另一种优选实施方案中,所述缓冲系统包括一水合柠檬酸,柠檬酸钠,二水合磷酸氢二钠,和 / 或二水合磷酸二氢钠。在另一种实施方案中,所述缓冲系统包括大约 1.3mg/ml 的柠檬酸 (例如,1.305mg/ml),大约 0.3mg/ml 的柠檬酸钠 (例如,0.305mg/ml),大约 1.5mg/ml 的二水合磷酸氢二钠 (例如 1.53mg/ml),大约 0.9mg/ml 的二水合磷酸二氢钠 (例如,0.86),和大约 6.2mg/ml 的氯化钠 (例如,6.165mg/ml)。在其他优选实施方案中,所述缓冲系统包括 1-1.5mg/ml 的柠檬酸,0.25-0.5mg/ml 的柠檬酸钠,1.25-1.75mg/ml 的二水合磷酸氢二钠,0.7-1.1mg/ml 的二水合磷酸二氢钠,和 6.0-6.4mg/ml 的氯化钠。在另一种实施方案中,所述制剂的 pH 是用氢氧化钠调节的。

[0073] 在所述制剂中还包括可以作为渗透压调节剂并且能够稳定所述抗体的多元醇。将所述多元醇添加到所述制剂中,其用量可以根据需要的所述制剂的等渗性而改变。所述含水的制剂优选是等渗透的。所添加的多元醇的量还可以根据多元醇的分子量而改变。例如,与二糖 (如海藻糖) 相比,可以添加较少量的单糖 (例如甘露糖醇)。在本发明的优选实施方案中,被作为渗透压调节剂用在所述制剂中的多元醇是甘露糖醇。在本发明的优选实施方案中,甘露糖醇的浓度为大约 5-20mg/ml。在本发明的另一种优选实施方案中,甘露糖醇的浓度为大约 7.5-15mg/ml。在本发明的制剂的更优选的实施方案中,甘露糖醇的浓度为大约 10-14mg/ml。在最优选的实施方案中,甘露糖醇的浓度为大约 12mg/ml。在本发明的另一种实施方案中,在所述制剂中含有多元醇山梨糖醇。

[0074] 另外,将去污剂或表面活性剂添加到所述抗体制剂中。典型的去污剂包括非离子去污剂,如失水山梨醇聚氧乙烯醚脂肪酸酯 (例如失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚月桂酸酯,失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯等) 或泊洛沙姆 (例如泊洛沙姆 188)。所添加的去污剂的量是这样的,它能减少所述制备的抗体的聚集和 / 或减少颗粒在所述制剂中的形成和 / 或减少吸附。在本发明的优选实施方案中,所述制剂包括聚山梨醇酯作为表面活性剂。在本发明的另一种优选实施方案中,所述制剂包括去污剂失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯

或吐温 80。吐温 80 是用于表示聚氧乙烯 (20) 失水山梨醇一油酸酯的名词 (参见 Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th edi., 1996)。在一种优选实施方案中,所述制剂包括大约 0.1- 大约 10mg/ml 的失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯,更优选大约 0.5- 大约 5mg/ml。在另一种优选实施方案中,在本发明的制剂中存在大约 0.1% 失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯。

[0075] 在本发明的优选实施方案中,所述制剂是装在管形瓶瓶中的含有下面表 1 所示成分的 0.8mL 的溶液。

[0076] 表 1

[0077] 具有用于注射的 0.8mL 溶液¹⁾ 的 1 个管形瓶包括:

[0078]

成分的名称	用量	功能
活性物质: 抗体 (D2E7) ²⁾	40.0 mg	活性物质
赋形剂:		
甘露糖醇	9.6 mg	渗透压调节剂
柠檬酸一水合物 柠檬酸	1.044 mg	缓冲液
柠檬酸钠 柠檬酸钠	0.244 mg	缓冲液
二水合磷酸氢二钠 二水合磷酸氢二钠	1.224 mg	缓冲液
二水合磷酸二氢钠 二水合磷酸二氢钠	0.688 mg	缓冲液
氯化钠	4.932 mg	渗透压调节剂
失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯	0.8 mg	去污剂
注射用水	759.028-	溶剂
注射用水	759.048 mg	
氢氧化钠 ³⁾	0.02-0.04 mg	PH 调节剂
总计	817.6 mg	

[0079] ¹⁾ 溶液的密度: 1.022g/mL

[0080] ²⁾ 以浓缩物形式使用

[0081] ³⁾ 作为 1M 溶液添加

[0082] 在一种实施方案中,所述制剂包括上面所鉴定的试剂 (即抗体,缓冲液,多元醇和去污剂),并且基本上不含一种或多种防腐剂,如苯甲醇,苯酚,间甲酚,氯丁醇和苯索氯铵。

在另一种实施方案中,可以在所述制剂中添加防腐剂,特别是在所述制剂是多剂量制剂时需要添加。在所述制剂中可以添加一种或多种其他可以药用的载体,赋形剂或稳定剂,如在 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) 中所披露的,只要它们不会对所述制剂的需要的特征造成显著的负面影响就行。可以接受的载体,赋形剂或稳定剂在所使用和所包含的剂量和浓度下对受体是无毒的,并且包括其他缓冲剂;助溶剂;包括抗坏血酸和甲硫氨酸的抗氧化剂;诸如 EDTA 的螯合剂;金属复合物(例如 Zn-蛋白复合物);诸如聚酯的生物可降解的聚合物;和/或诸如钠的成盐抗衡离子。

[0083] 根据要治疗的特定适应症的需要,本发明的制剂还可以与一种或多种其他治疗剂组合,优选那些不会对所述制剂的抗体产生负面影响的具有互补活性的治疗剂。所述治疗剂适合以对预期的目的有效的量组合存在。可以与本发明的制剂组合的其他治疗剂进一步披露于分别被收作本文参考的美国专利号 6,090,382 和 6,258,562 中。

[0084] 被用于体内施用的制剂必须是无菌的。在制备所述制剂之前或之后,通过用无菌过滤膜过滤,可以方便地实现这一目的。

[0085] IV. 制剂的施用

[0086] 本发明的制剂可用于在分别被收作本文参考的美国专利号 6,090,382 和 6,258,562 中披露的类似适应症中,并且在下面进一步详细说明。

[0087] 短语所述制剂的“有效量”是抑制 TNF α 活性所必需或足够的用量,例如,抑制有害的 TNF α 活性相关状态的各种形态学或身体症状。在另一种实施方案中,所述制剂的有效量是获得需要的结果所必需的用量。在一种例子中,所述制剂的有效量是足以抑制有害的 TNF α 活性的用量。在另一种例子中,所述制剂的有效量为 0.8mL 的含有 40mg 抗体的所述制剂,如表 1 中所披露的。所述有效量可以根据以下因素而改变,如受试者的身材和体重,或疾病的类型。例如, TNF α 活性-抑制制剂的选择可能影响“有效量”的构成。本领域普通技术人员能够研究上述因素,并且可以在不进行过多试验的情况下,确定 TNF α 活性抑制制剂的有效量。

[0088] 施用方案可能影响有效量的构成。可以在有害的 TNF α 活性发作之前和之后给所述受试者施用 TNF α 活性-抑制制剂。另外,能够每天或顺序施用若干个分开的剂量,以及交错的剂量,或者所述剂量可以是连续输入的,或者可以是药团注射。另外, TNF α 活性-抑制制剂的剂量可以根据治疗或预防情况的要求成比例地增加或减少。

[0089] 术语“治疗”包括与要治疗的状况,病症或疾病相关或引起的至少一种症状的减轻或缓解。例如,治疗可以是减轻病症的一种或几种症状或彻底根除病症。

[0090] 本发明药物制剂中的活性成分(抗体)的实际剂量水平可以改变,以便获得能有效实现对特定患者,组合物,和施用模式,而又对所述患者无毒的所需治疗反应的活性成分的用量。

[0091] 选择的剂量水平取决于多种因素,包括存在于所述制剂中的抗体的活性,施途径,施用时间,所采用的特定化合物的排泄速度,治疗的持续时间,其他药物,用于与所采用的特定化合物组合的其他药物,化合物和/或物质,要治疗患者的年龄,性别,体重,状态,一般健康状况和以前的医疗史,以及医学领域所熟知的类似因素。

[0092] 具有本领域普通技能的医生或兽医能够方便地确定并且开出所需要的本发明药用组合物的有效量。例如,医生或兽医开始时可以将低于需要水平的剂量的本发明的化合

物用于所述药物制剂中,以便获得需要的治疗作用,并逐渐加大所述剂量,直到获得所述需要的效果。

[0093] 一般,本发明制剂的合适的每日剂量是所述制剂能有效产生治疗作用的最低剂量。所述有效剂量一般取决于上文所述因素。本发明制剂的有效量是能抑制患有 TNF α 活性是有害的病症的受试者体内的 TNF α 活性的用量。在优选实施方案中,所述制剂每次注射活性成分抗体,能提供 40mg 的有效剂量。在另一种实施方案中,所述制剂提供了在大约 1-150mg 抗体范围内的有效剂量。如果需要的话,所述药物制剂的有效的每日剂量可以在一天中以合适的间隔分开二个,三个,四个,五个,六个或更多个亚剂量分别施用,任选以单位剂型施用。

[0094] 在本发明的一种实施方案中,所述制剂中的抗体剂量为大约 5- 大约 80mg。在另一种实施方案中,所述制剂中的抗体剂量为大约 25- 大约 50mg。所述制剂特别适用于超过 15mg 的大的抗体剂量。在本发明的优选实施方案中,所述制剂提供了剂量为大约 40mg 的抗体。在另一种优选实施方案中,所述抗体针对 TNF α 。在最优选的实施方案中,所述抗体是 D2E7。

[0095] 在本发明的一种实施方案中,所述制剂中的抗体剂量为大约 1-150mg, 大约 5-145mg, 大约 10-140mg, 大约 15-135mg, 大约 20-130mg, 大约 25-125mg, 大约 30-120mg, 大约 35-115mg, 大约 40-110mg, 大约 45-105mg, 大约 50-100mg, 大约 55-95mg, 大约 60-90mg, 大约 65-85mg, 大约 70-80mg, 或大约 75mg。在优选实施方案中,所述抗体的剂量为 40mg。在另一种实施方案中,抗体针对 TNF α 。在最优选的实施方案中,所述抗体是 D2E7。介于上述剂量之间的范围,例如,大约 2-149mg 也属于本发明的一部分。例如,使用上述任意值的组合作为上限和 / 或下限的值的范围也包括在本发明范围内。

[0096] 应当指出的是,剂量值可以根据要缓解的状况的严重程度而改变。还应当理解的是,对于任何特定受试者来说,具体的剂量方案应当根据个体的需要的和管理或监督所述组合物施用的人员的专业判断随时调整,并且,本文所提供的剂量范围仅仅是代表性的,并非要限定要求保护的组合物的范围或操作。

[0097] 本发明提供了具有长的保质期的药物制剂,在一种实施方案中,该制剂被用于在患有 TNF α 活性是有害的病症的受试者体内抑制 TNF α 活性,包括给所述受试者施用本发明的抗体或抗体部分,以便抑制所述受试者体内的 TNF α 活性。优选的是,所述 TNF α 是人 TNF α , 并且所述受试者是人类受试者。另外,所述受试者可以是表达与本发明的抗体交叉反应的 TNF α 的哺乳动物。另外,所述受试者可以是业已导入了 hTNF α 的哺乳动物(例如,通过施用 hTNF α 或通过表达 hTNF α 转基因)。本发明的制剂可以出于治疗目的给人类受试者施用(在下面进一步讨论)。在本发明的一种实施方案中,所述液体药物制剂是便于施用的,它包括,例如,由患者自己施用的制剂。在优选实施方案中,本发明的制剂是通过皮下注射施用的,优选单次使用。另外,本发明的制剂可以给非人哺乳动物施用,所述哺乳动物能表达与抗体交叉反应的 TNF α (例如,灵长类,猪或小鼠),用于兽医目的,或作为人类疾病的动物模型。就后一种情况而言,所述动物模型可用于评估本发明抗体的疗效(例如,测试施用的剂量和时程)。

[0098] 在本文中,术语“其中 TNF α 活性是有害的病症”意在包括这样的疾病和其他病症:其中, TNF α 在患有所述疾病的受试者体内的存在,业已被证实或被怀疑造成了所述疾

病的病理生理学或者是导致所述病症恶化的因素。因此,其中 TNF α 活性是有害的病症是这样的病症:其中,抑制 TNF α 活性,预计能缓解所述病症的症状和/或进展。所述病症可能表现为,例如,在患有所述病症的受试者的生物学流体中 TNF α 浓度的增加(例如,在受试者的血清,血浆,滑液等中 TNF α 浓度的增加),例如,这种增加可以使用上文所述的抗 TNF α 抗体检测。

[0099] 存在多种其中的 TNF α 活性是有害的病症的例子。其中 TNF α 活性是有害的病症的例子披露于被收作本文参考的美国申请号 60/397275 中。其中 TNF α 活性是有害的病症的例子还披露于分别被收作本文参考的美国专利号 6,015,557,6,177,077,6,379,666,6,419,934,6,419,944,6,423,321 和 6,428,787; 美国专利申请号 US2001/0016195, US2001/0004456, 和 US2001/026801; WO 00/50079 和 WO 01/49321。

[0100] 下面进一步讨论本发明的抗体和抗体部分在治疗具体病症方面的应用:

[0101] A. 脓毒症

[0102] 业已确定了肿瘤坏死因子在脓毒症的病理生理学中的作用,具有包括低血压,心肌抑制,血管渗露综合征,器官坏死,刺激有毒的二级介质释放和激活凝血级联反应的生物学作用(例如,参见, Tracey, K. J. 和 Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503; Russell, D 和 Thompson, R. C. (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4:714-721)。因此,本发明的制剂可用于治疗任何临床状况的脓毒症,包括脓毒性休克,内毒素性休克,革兰氏阴性菌脓毒症和中毒性休克综合征。

[0103] 另外,为了治疗脓毒症,本发明的制剂可以与能够进一步缓解脓毒症的一种或多种其他治疗剂共同施用,如白介素-1 抑制剂(如在 PCT 公开号 W092/16221 和 W0 92/17583 中所披露的),细胞因子白介素-6(例如,参见 PCT 公开号 W0 93/11793) 或血小板活化因子的拮抗剂(例如,参见欧洲专利申请公开号 EP 374510)。

[0104] 另外,在优选实施方案中,本发明的制剂是给脓症患者亚类中的人类患者施用的,这些患者在治疗时的 IL-6 的血清或血浆浓度超过 500pg/ml,更优选 1000pg/m(参见 Daum, L. 等的 PCT 公开号 W095/20978)。

[0105] B. 自身免疫性疾病

[0106] 肿瘤坏死因子业已被证实在多种自身免疫性疾病的病理生理学中发挥作用。例如,业已证实在类风湿性关节炎中 TNF α 参与了激活组织炎症并且导致关节破坏(例如,参见 Tracey 和 Cerami, 同上; Arend, W. P. 和 Dayer, J-M. (1995) *Ar th. Rheum.* 38:151-160; Fava, R. A. 等 (1993) *Clin. Exp. Immunol.* 94:261-266)。另外,业已证实了 TNF α 能促进胰岛细胞死亡,并且介导糖尿病中的胰岛素抗性(例如,参见 Tracey 和 Cerami, 同上; PCT 公开号 W0 94/08609)。另外,业已证实了 TNF α 参与介导对少突细胞的细胞毒性,并且诱导了多发性硬化中的炎性斑(例如,参见 Tracey 和 Cerami, 同上)。业已对嵌合的和人源化的鼠抗-hTNF α 抗体进行了治疗类风湿性关节炎的临床试验(例如,参见, Elliott, M. J., 等 (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M. J., 等 (1994) *Lancet* 344:1105-1110; Rankin, E. C., 等 (1995) *Br. J. Rheumatol.* 34:334-342)。

[0107] 本发明的制剂可用于治疗自身免疫性疾病,特别是与炎症相关的那些,包括类风湿性关节炎,类风湿性脊柱炎,骨关节炎和痛风性关节炎,过敏,多发性硬化,自身免疫性糖尿病,自身免疫性眼色素层炎和肾病综合征。通常,所述制剂是系统性施用的,不过,对于

某些病症来说,将所述抗体或抗体部分局部施用于炎症部位可能是有利的(例如,在类风湿性关节炎的关节中的局部施用或在糖尿病性溃疡上的局部施用,单独施用,或者与环己烷- γ lidene 衍生物组合施用,正如在 PCT 公开号 W093/19751 中所披露的)。

[0108] C. 传染病

[0109] 业已证实了肿瘤坏死因子参与了在多种传染病中发现的介导性生物学作用。例如,业已证实了 TNF α 参与介导脑炎症和疟疾中的毛细血管栓塞和梗塞(例如,参见 Tracey 和 Cerami,同上)。另外,业已证实了 TNF α 参与了介导脑炎症,并且在脑膜炎中诱导血脑屏障的降解,诱导脓毒性休克综合征,激活了静脉栓塞(例如,参见 Tracey 和 Cerami,同上)。另外,业已证实 TNF α 参与了在获得性免疫缺陷综合征(AIDS)中刺激病毒繁殖并且介导中枢神经系统损伤(例如,参见 Tracey 和 Cerami,同上)。因此,本发明的抗体和抗体部分可用于治疗传染病,包括细菌性脑膜炎(例如,参见欧洲专利申请公开号 EP 585 705),脑型疟疾,AIDS 和 AIDS-相关的并发症(ARC)(例如,参见欧洲专利申请公开号 EP 230574),以及在移植之后的巨细胞病毒感染(例如,参见 Fietze, E.,等(1994)Transplantation 58:675-680)。本发明的制剂还可用于缓解与传染病相关的症状,包括由于感染(如流感)导致的发热和肌痛,和继发于感染的恶病质(例如,在 AIDS 或 ARC 之后)。

[0110] D. 移植

[0111] 业已证实肿瘤坏死因子是同种异体移植物的排斥和移植物抗宿主疾病(GVHD)的关键介质,并且介导了在将抗 T 细胞受体 CD3 复合物的大鼠抗体 OKT3 用于肾脏移植排斥时出现的负面反应(例如,参见 Tracey 和 Cerami,同上;Eason, J. D.,等(1995)Transplantation 59:300-305;Suthanthiran, M. 和 Strom, T. B.(1994)New Engl. J. Med. 331:365-375)。因此,本发明的制剂可用于移植移植物排斥,包括同种异体移植物的排斥和异种移植物的排斥,并且抑制 GVHD。尽管所述抗体或抗体部分可以单独使用,更优选的是,它是与能抑制针对同种异体移植物的免疫反应或抑制 GVHD 的一种或多种其他试剂组合使用。例如,在一种实施方案中,本发明的制剂与 OKT3 组合用于抑制 OKT3-诱导的反应。在另一种实施方案中,本发明的制剂是与针对调节免疫反应中的其他目标,如细胞表面分子 CD25(白介素-2 受体- α),CD11a(LFA-1),CD54(ICAM-1),CD4,CD45,CD28/CTLA4,CD80(B7-1)和/或 CD86(B7-2)的一种或多种抗体组合使用的。在另一种实施方案中,本发明的制剂是与一种或多种普通免疫抑制剂,如环孢菌素 A 或 FK506 组合使用的。

[0112] E. 恶性肿瘤

[0113] 业已证实肿瘤坏死因子参与诱导恶病质,刺激肿瘤生长,促进转移潜力并且在恶性肿瘤中介导细胞毒性(例如,参见 Tracey 和 Cerami,同上)。因此,本发明的制剂可用于治疗恶性肿瘤,抑制肿瘤生长或转移和/或缓解继发于恶性肿瘤的恶病质。所述制剂可以系统性施用或局部用于肿瘤部位。

[0114] F. 肺病

[0115] 业已证实肿瘤坏死因子与成人呼吸窘迫综合征的病理生理学相关,包括刺激白细胞-内皮细胞活化,指导对肺细胞的细胞毒性,并且诱导血管渗露综合征(例如,参见 Tracey 和 Cerami,同上)。因此,本发明的制剂可用于治疗各种肺病,包括成人呼吸窘迫综合征(例如,参见 PCT 公开号 WO 91/04054),休克肺,慢性肺炎性疾病,肺肉样瘤病,肺纤维化和矽肺。所述制剂可以系统性施用或局部用于肺表面,例如,作为气溶胶使用。

[0116] G. 肠道疾病

[0117] 业已证实肿瘤坏死因子与炎性肠病的病理生理学相关（例如，参见 Tracy, K. J., 等 (1986) *Science* 234 :470-474 ;Sun, X-M., 等 (1988) *J. Clin. Invest.* 81 :1328-1331 ; MacDonald, T. T. 等 (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 81 :301-305)。嵌合的鼠抗-hTNF α 抗体业已进行了用于治疗克隆氏病的临床试验 (van Dullemen, H. M. 等, (1995) *Jastroenterology* 109 :129-135)。本发明的制剂还可用于治疗肠道疾病, 如特发性炎性肠病, 它包括两种综合征, 克隆氏病和溃疡性大肠炎。

[0118] H. 心脏病

[0119] 本发明的制剂还可用于治疗各种心脏疾病, 包括心脏局部缺血（例如, 参见欧洲专利申请公开号 EP453898) 和心功能不全 (心肌衰弱) (例如, 参见 PCT 公开号 W094/20139)。

[0120] I. 其他疾病

[0121] 本发明的药物制剂还可用于治疗其中 TNF α 活性是有害的各种其他病症。其中业已证实 TNF α 活性与病理生理学相关的其他疾病和病症的例子包括炎性骨骼疾病, 和骨再吸收疾病（例如, 参见 Bertolini D. R. 等 (1986) *Nature* 319 :516-518 ;Konig, A. 等 (1988) *J. Bone Miner. Res.* 3 :621-627 ;Lerner, U. H. 和 Ohlin, A. (1993) *J. Bone Miner. Res.* 8 : 147-155 ;

[0122] 和 Shankar, G. 和 Stern, P. H. (1993) *Bone* 14 :871-876), 肝炎, 包括酒精性肝炎 (例如, 参见 McClain, C. J. 和 Cohen, D. A. (1989) *Hepatology* 9 :349-351 ;Felver, M. E., 等 (1990) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14 :255-259 ;和 Hansen, J. 等 (1994) *Hepatology* 20 :461-474) 和病毒性肝炎 (Sheron, N. 等 (1991) *J. Hepatol.* 12 :241-245 ;和 Hussain, M. J. 等 (1994) *J. Clin. Pathol.* 47 :1112-1115), 凝血障碍 (例如, 参见 van der Poll, T. 等 (1990) *N. Engl. J. Med.* 322 :1622-1627 ;和 van der Poll, T. 等 (1991) *Prog. Clin. Biol. Res.* 367 :55-60), 烧伤 (例如, 参见 Giroir, B. P., 等 (1994) *Am. J. Physiol.* 267 :H118-124 ;和 Liu, X. S. 等 (1994) *Burns* 20 :40-44), 再灌注损伤 (例如, 参见 Scales, W. E. 等 (1994) *Am. J. Physio.* 267 :G1122-1127 ;Serrick, C., 等 (1994) *Transplantation* 58 :1158-1162 ;和 Yao, Y. M. 等 (1995) *Resuscitation* 29 :157-168), 瘢痕疙瘩 (例如, 参见 McCauley, R. L., 等 (1992) *J. Clin. Immunol.* 12 :300-308), 疤痕组织形成 ;发热 ;牙周疾病 ;肥胖和辐射毒性。

[0123] 其中 TNF α 活性是有害的其他疾病包括, 但不局限于成人 Still' s 病, 阿耳茨海默氏病, 强直性脊柱炎, 哮喘, 癌和恶病质, 动脉粥样硬化, 慢性动脉粥样硬化, 慢性疲劳综合征, 肝功能衰竭, 慢性肝功能衰竭, 阻塞性肺病, 慢性阻塞性肺病, 充血性心力衰竭, 皮肤多肌炎, 糖尿病大血管病, 子宫内膜异位, 家族性周期热, 纤维化, 血液透析, Jarisch-Herxheimer 反应, 新生儿 RA, 川崎综合征, 骨髓发育异常综合征, 心肌梗死, *panciaticular vulgaris*, 牙周疾病, 周围神经病, 多关节的, 多肌炎, 渐进性肾衰竭, 牛皮癣, 牛皮癣关节炎, 赖特尔综合征, 肉样瘤病, 硬皮病, 脊柱关节病, Still' s 病, 中风, 与治疗相关的综合征, 治疗诱导的炎性综合征, 在使用 IL-2 之后的炎性综合征, 胸腹主动脉瘤修复 (TAAA), *Vasulo-Behcet' s* 病, 黄热病免疫, 1 型糖尿病, 2 型糖尿病, 神经病性疼痛, 坐骨神经痛, 脑水肿, 在脊髓中和 / 或周围的水肿, 脉管炎, 韦格内氏内芽肿, 颞动脉炎,

风湿性多肌痛, Takayasu's 动脉炎, 结节性多动脉炎, 显微性多血管炎, Churg-Strauss 综合征, Felty's 综合征, Sjogren's 综合征, 混合性结缔组织病, 复发性多软骨炎, 假痛风, 假体松弛, 自身免疫性肝炎, 硬化性胆管炎, 急性胰腺炎, 慢性胰腺炎, 肾小球肾炎, 链球菌感染后肾小球肾炎或 IgA 肾病, 风湿性心脏病, 心肌病, 睾丸炎, 脓皮病, 多发性骨髓瘤, TNF 受体相关的周期性综合征 [TRAPS], 动脉粥样硬化, 类固醇依赖型巨细胞动脉炎肌炎, 眼色素层炎, 和药物反应。

[0124] 在下面的实施例中对本发明作进一步说明, 这些实施例不应当被理解成进一步的限定。在本申请中所引用的所有文献, 待批专利申请和公开的专利的内容被专门收作本文参考。

实施例

[0125] 实施例 1: 制剂的制备

[0126] 本发明的药物制剂是按照以下方法制备的。

[0127] 用于所述制剂中的材料包括: 甘露糖醇, 一水合柠檬酸 (柠檬酸), 柠檬酸钠, 二水合磷酸氢二钠, 二水合磷酸二氢钠, 氯化钠, 失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯, 注射用水, 氢氧化钠, 它是以 1M 溶液形式提供的, 以便调整 pH, 和蛋白浓缩物 (例如, 抗体浓缩物)。

[0128] 制备 20L 缓冲液 (相当于 20.180kg- 溶液的密度: 1.009g/ml)

[0129] 称量出以下重量的成分: 240.0g 甘露糖醇, 26.1g 一水合柠檬酸, 6.1g 柠檬酸钠, 30.6g 二水合磷酸氢二钠, 17.2g 二水合磷酸二氢钠, 123.3g 氯化钠, 20.0g 失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯, 和 19,715.7-19,716.1g 的水。

[0130] 通过将 40.0g 的氢氧化钠与 1000.8g 的注射用水混合制备氢氧化钠溶液。

[0131] 然后, 通过将以下预先称量好的成分 (如上文所述) 溶解在大约 90% 的注射用水中制备缓冲液: 甘露糖醇, 一水合柠檬酸, 柠檬酸钠, 二水合磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 氯化钠, 和失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯。业已证实, 添加缓冲液成分的顺序并不重要, 因此可以随意选择。

[0132] 在添加上述所有缓冲液成分之后, 用按上述方法制备的 1M 氢氧化钠调节该溶液的 pH。在添加氢氧化钠之后, 添加最终重量的水。然后通过过滤膜 (亲水性聚偏二氟乙烯, 0.22 μ m 孔径) 将缓冲溶液过滤到无菌容器中。所使用的过滤介质是过滤消毒的氨气。

[0133] 制备 40L 制剂 (相当于 40.88kg)

[0134] 然后将过滤的缓冲溶液添加到按以下方法制备的解冻的并且合并的抗体浓缩物 (所述药物制剂的活性成分) 中。在制备所述药物制剂之前在水浴中对所述抗体 (浓缩物) 进行解冻。使用 34.207g 抗体浓缩物, 它相当于 2.0kg 的蛋白, 浓度为 60mg 蛋白/mL 蛋白浓缩物。所述浓缩物的密度为 1.0262g/mL。可以使用 25.655-37.316 范围内的任何蛋白浓缩物, 它相当于蛋白浓缩物中蛋白的浓度为 55-80mg/mL。在搅拌状态下添加所述缓冲液, 直到达到总溶液的最终重量。

[0135] 然后按照上述方法, 通过过滤对包含它的所有成分的制剂进行过滤, 所不同的是所述制剂是通过两层无菌 0.22 μ m 的膜过滤器过滤的。在消毒之后, 对所述制剂进行包装, 以便在管形瓶或预先填充的注射器中使用。

[0136] 技术人员还可以理解的是,本文所提到的重量和 / 或重量与体积比可以利用所述成分的公知的分子量换算成摩尔和 / 或摩尔浓度。本文所列举的重量 (例如, g 或 kg) 是用于所述体积的 (例如, 缓冲液或药物制剂)。技术人员可以理解的是, 在需要不同的制剂体积时, 可以成比例地调整所述重量。例如, 32L, 20L, 10L, 5L 或 1L 制剂分别包括 80%, 50%, 25%, 12.5% 或 2.5% 的所列举的重量。

[0137] 实施例 2: 冻 / 融研究

[0138] 在选择 D2E7 抗体的所述制剂缓冲液之后, 将药物物质配制到相同的基质中, 作为最终的产品。

[0139] 通过将药物物质从冷冻状态转变成液体状态循环 3 次, 评估蛋白浓度为 63mg/mL 的 D2E7 抗体药物的冻融表现。表 N 表示在有和没有 0.1% 失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯的条件下, 分别从 -80°C 或 -30°C 开始评估 3 次快速和慢速冻 / 融循环的效果的实验的结果。

[0140] 表 2 表示 D2E7 抗体药物物质可以解冻 / 冷冻至少 3 次, 而对化学 (阳离子交换 HPLC, 大小排阻 HPLC, 颜色, pH), 物理化学特性 (在显微镜下才能看到的颗粒, 透明性) 或生物学活性 (体外 TNF 中和测定) 不产生任何有害的作用。表 2 还表明了添加失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯, 改善了 D2E7 抗体药物物质的物理化学特性, 表现为无论是慢速或快速冻 / 融循环, 都具有较少数量的只有在显微镜下才能看到的颗粒 (参见表 2 中的阴影区)。

[0141] 表 2: 在有 / 没有失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯的条件下, 冻融对 D2E7 抗体药物物质的影响

[0142]

测试指标	失水山梨醇聚氧乙烯醚脂肪酸酯 (0.1%) ^D	无冻/融	在冰箱中从 -30°C 慢速解冻	在水浴中从 -30°C 快速解冻	在冰箱中从 -80°C 慢速解冻	在水浴中从 -80°C 快速解冻
透明性	-	25.0	22.5	25.3	25.8	25.6
	+	27.8	28.1	28.2	28.0	28.1
颜色	-	≤ B9	≤ B9	≤ B9	≤ B9	≤ B9
	+	≤ B9	≤ B9	≤ B9	≤ B9	≤ B9
pH	-	5.01	5.02	5.02	5.02	5.02
	+	5.02	5.02	5.02	5.02	5.02
在显微镜下才能看到的颗粒	-	42	600	303	1891	303
		2	4	5	8	0
	+	0	5	1	0	8
大小排阻 HPLC	-	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8
	+	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8
阳离子交换 HPLC	-	87.1	87.0	87.2	86.9	86.9
	+	86.8	87.0	87.1	87.3	86.8
体外 TNF 中和试验	-	118.0	123.8	118.0	103.3	120.5
	+	111.8	96.2	100.9	96.7	95.8

[0143] 1)+ = 具有 0.1% 失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯的制剂 ; - = 没有 0.1% 失水山梨醇聚氧乙烯 (20) 醚油酸酯的制剂

[0144] 实施例 3 : 微生物研究

[0145] 进行了试验, 以便确定所述制剂是否能支持微生物生长。来自这些试验的结果表明, 如果在 20-25°C 下保存 14 天, 所述制剂不支持微生物生长。该结果是通过用微生物 (例如, 金黄色葡萄球菌, ATCC-No. : 6538P, 白色念珠菌, ATCC-No. : 10231, 黑曲霉, ATCCC-No. : 16404, 绿脓假单胞菌, ATCC-No. : 9027, 环境分离物) 在低水平 (MMT 100cfu/mL) 下直接接种所述无菌制剂确定的。然后检查接种过的制剂的总体微生物生长, 例如, 浊度的改变。浊度的缺乏是没有总体生长的指标, 并且在 14 天之后在接种的容器中检测。另外, 从这些容器中不能重新分离到微生物。因此, 所得到的结论是, 在上述条件下, 所述制剂不支持微生物生长。

[0146] 时参考文献的引用

[0147] 在本文中所引用的所有文献和专利的内容被以它们的整体形式收作本文参考。

[0148] 等同方案

[0149] 本领域技术人员可以理解的是, 或者能够不超过常规实验的方式确定本文所披露的本发明具体实施方案的很多等同方案。这些等同方案被认为包括在以下权利要求书的范围内。

[0001]

序列表

<110> Krause, Hans Juergen

Baust, Lisa

Dickes, Michael

<120>用于治疗 TNF- α 相关病症的人抗体的制剂

<130> BBC-166

<140> 10/222140

<141> 2002-08-16

<160> 34

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0002]

<223> 突变的人抗体

<400> 2

```

Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1           5           10           15
Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
           20           25           30
Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
           35           40           45
Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser
           50           55           60
Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65           70           75           80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
           85           90           95
Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp
           100          105          110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115          120

```

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<220>

<221> 变体

<222> 10

<223> Xaa = Thr 或 Ala

<400> 3

```

Pro Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1           5           10

```

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<220>

[0003]

<221> 变体

<222> 13

<223> Xaa = Tyr 或 Asn

<400> 4

Pro Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 5

Pro Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 6

Pro Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Glu Gly

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 7

Pro Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

[0004]

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 8

Pro Asp Tyr Ala Met His

1

5

<210> 9

<400> 9

000

<210> 10

<400> 10

000

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 11

Pro Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala

1

5

10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 12

Pro Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala

[0005]

1	5	10
<210> 13		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 突变的人抗体		
<400> 13		
Pro Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr		
1	5	10
<210> 14		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 突变的人抗体		
<400> 14		
Pro Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr		
1	5	10
<210> 15		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 突变的人抗体		
<400> 15		
Pro Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr		
1	5	10
<210> 16		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

[0006]

<223> 突变的人抗体

<400> 16

Pro Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 17

Pro Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 18

Pro Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 19

Pro Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5 10

<210> 20

<211> 10

[0007]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 20

Pro	Gln	Lys	Tyr	Asn	Arg	Ala	Pro	Tyr	Asn
1				5					10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 21

Pro	Gln	Lys	Tyr	Asn	Ser	Ala	Ala	Tyr	Ser
1				5					10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 22

Pro	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr
1				5					10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 23

Pro	Gln	Lys	Tyr	Asn	Ser	Asp	Pro	Tyr	Thr
1				5					10

[0008]

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的人抗体

<400> 24
 Pro Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5 10

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的人抗体

<400> 25
 Pro Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
 1 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的人抗体

<400> 26
 Pro Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1 5 10

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的人抗体

[0009]

<400> 27

Pro Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 28

Pro Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 29

Pro Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 30

Pro Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

[0010]

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 31

Pro Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 32

Pro Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 33

Pro Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的人抗体

<400> 34

Pro Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10